

Aus der
Klinik für Kleintiere (Chirurgie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

und

der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie
der Uniklinik der RWTH Aachen
Betreuer: Prof. Dr. M. A. Brockmann

**Spezielle Bildgebung (Computertomographie-Angiographie, digitale
Subtraktionsangiographie und molekularer Ultraschall) bei vaskulären
Fragestellungen am Schwein als Tiermodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Lisa Kabelitz

Tierärztin aus Dortmund

Aachen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer
Prof. Dr. M. A. Brockmann

Tag der Disputation: 17.02.2017

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Die Bedeutung von Tieren für die wissenschaftliche Forschung	8
2. Literaturübersicht	10
2.1. Das Schwein als Versuchstier	10
2.2. Arterielle Gefäßversorgung der Hintergliedmaße beim Schwein	11
2.3. Vaskuläre Verschlussysteme	13
2.3.1. Angio-Seal Vascular Closure Device	14
2.3.2. Vaskuläre Verschlussysteme im Tiermodell	18
2.4. Bedeutung bildgebender Methoden für tierexperimentelle Studien	18
2.4.1. Computertomographie.....	19
2.4.2. Computertomographie-Angiographie	20
2.4.3. Digitale Subtraktionsangiographie	21
2.4.4. Sonographie und molekularer Ultraschall.....	22
2.5. Ziel der Dissertation	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Anwendung des Angio-Seal VCD	25
3.1.1. Anästhesie	25
3.1.2. Applikation des Angio-Seal VCD.....	25
3.1.3. Medikation	25
3.1.4. Kontrolluntersuchungen	26
3.1.5. Auswertung.....	27
3.1.6. Histopathologische Untersuchung	27
3.2. Molekularer Ultraschall	27
3.2.1. Evaluation der durch den Einsatz von Microbubbles bedingten Komplement-Aktivierung.....	28
3.2.2. Evaluation der spezifischen Bindung von Microbubbles an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	28
3.2.3. In vivo Erzeugung einer Endothelverletzung	29
3.2.4. Analyse der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in porcinen Arterien mit molekularem Ultraschall.....	30
3.2.5. Immunhistologische Analyse.....	30
4. Ergebnisse	32

4.1. Ergebnisse der Untersuchungen zum Einsatz des Angio-Seal VCD im Minipig	32
4.1.1. Bildgebung	33
4.1.2. Histopathologie	37
4.2. Ergebnisse des molekularen Ultraschalls unter Verwendung spezieller Microbubbles zum Monitoring des Heilungsprozesses einer Endothelverletzung im Minipig	40
4.2.1. In vitro Komplement-Aktivierung.....	40
4.2.2. Spezifischen Bindung von Microbubbles an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	40
4.2.3. Analyse der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in porcinen Arterien mit molekularem Ultraschall.....	40
4.2.4. Immunhistologische Analyse.....	41
5. Übergreifende Diskussion	42
6. Zusammenfassung	51
7. Summary	53
8. Publikationen	55
8.1. Erstautorenschaften	55
8.2. Co-Autorenschaften	57
9. Literaturverzeichnis	65
10. Erklärung.....	74
Danksagung	75

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria, Arterie
Aa.	Arteriae, Arterien
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
atm	Atmosphäre
AV	Arterio-venös
bds	beidseits
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bpm	beats per minute / Schläge pro Minute
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CTA	Computertomographie –Angiographie
d	day(s), Tag(e)
dB	Dezibel
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine, Digitale Bildverarbeitung und -kommunikation in der Medizin
DL	Deutsche Landrasse
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
DRZE	Deutsches Zentrum für Ethik in den Biowissenschaften
EU	Europäische Union
et al.	et alii/ und andere
F	French
h	hour(s), Stunde(n)
Hz	Hertz
IU	international unit, internationale Einheiten
inkl.	inklusive
J	Jod
kg	Kilogramm, kilogram
KM	Kontrastmittel
M.	Musculus, Muskel
MB	Microbubbles, mit Gas gefüllte Kontrastmittelbläschen
mg	Milligramm, miligram

MHz	Megahertz
min	Minute(n), minute(s)
ml	Milliliter, milliliter
Mm.	Musculi, Muskeln
mm	Millimeter, millimeter
mPA	Millipascal
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Gruppengröße
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
NSAID	nicht-steroidales Antiphlogistikum
NRW	Nordrhein-Westfalen
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RL	Richtlinie
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n), second(s)
sog.	so genannt
SOS	snare-over-stent
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie
TFN	Tumornekrosefaktor
TierSchG	Tierschutzgesetz
usw.	und so weiter
V.	Vena, Vene
VAMP	vascular access mini-port
VCD	Vascular closure device; vaskuläres Verschlusssystem
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
µl	Mikroliter, microliter
µm	Mikrometer, micrometer
≤	kleiner gleich
<	kleiner
>	größer

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung von Tieren für die wissenschaftliche Forschung

Tiere werden in der Wissenschaft, und hier v. a. in der Grundlagenforschung, zur Entwicklung neuer Therapieformen, zur Erprobung und Prüfung neuer Materialien und Produkte, sowie zu toxikologischen Sicherheitsprüfungen eingesetzt. Ebenso legitimiert ist der Forschungseinsatz zur Förderung des Wohlergehens von Tieren (§ 7a TierSchG) [1].

Mäuse und Ratten bilden in Deutschland mit 81 % (Stand 2014) den größten Anteil aller eingesetzten Versuchstiere [2]. Neben Nagern werden auch Großtierspezies, allen voran das Schwein, für wissenschaftliche Zwecke genutzt [3]. Ihr Anteil an der Gesamtzahl aller verwendeten Tiere beträgt jedoch weniger als 1 % [4].

Etwa ein Drittel der Versuchstiere wird für die Grundlagenforschung genutzt. Davon werden 14–19 % zur Entwicklung neuer medizinischer Produkte, 7–9 % für die Qualitätskontrolle von Produkten für die Human-, Zahn- und Veterinärmedizin und 5–6 % für Sicherheitsprüfungen eingesetzt. Die Prüfung der Wirksamkeit von Schädlingsbekämpfungsmitteln, die Diagnose von Krankheiten, die Aus-, Fort- und Weiterbildung sowie die Gewebe- und Organentnahme stellen weitere Zwecke dar, zu denen Versuchstiere eingesetzt werden [4].

Nachdem in den vergangenen Jahren ein Trend zu steigenden Versuchstierzahlen zu beobachten war (+ 4,9 % in den Jahren 2010–2013), sank im Jahr 2013 die Anzahl der für wissenschaftliche Zwecke eingesetzten Tiere erstmals [4]. Im Vergleich zum Jahr 2012 reduzierte sich die Zahl um 2,7 % auf insgesamt 2 997 152 Tiere [5].

Trotz dieser scheinbar hohen Tierzahl bleibt anzumerken, dass die zu wissenschaftlichen Zwecken genutzten Versuchstiere mit 0,5 % einen nur sehr geringen Anteil aller jährlich in Deutschland getöteten Tiere ausmachen. Somit werden 95,5 % der Tiere zu anderen als zu Forschungszwecken getötet. Ein wesentlicher Faktor ist die Schlachtung zur Erzeugung tierischer Lebensmittel für den menschlichen Verzehr. Im Jahr 2012 wurden zu diesem Zweck alleine in Deutschland 58 349 687 Schweine, 3 654 794 Rinder und 1 084 658 Schafe getötet [6].

Dennoch sollten Tierversuche, gemäß dem 3R-Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement) von William Russel und Rex Burch (1959), im besten Fall vermieden werden (Replacement). Da dies trotz neu entwickelter Alternativ- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch bislang nicht immer möglich ist, sollte zumindest eine Reduktion der Tierzahl (Reduction) bzw. eine Verminderung des Belastungsgrades der Versuchstiere (Refinement) angestrebt werden.

Trotzdem sind Tierversuche zum heutigen Zeitpunkt in einigen Bereichen der wissenschaftlichen Forschung unerlässlich und können nicht durch in vitro Methoden ersetzt werden. Für bestimmte Fragestellungen bietet ein Tiermodell noch immer die beste Simulationsmöglichkeit des lebenden Organismus.

Die Anwendung von verschiedenen bildgebenden Verfahren wie Computertomographie (CT), CT-Angiographie (CTA), digitaler Subtraktionsangiographie (DSA) und molekularem Ultraschall am Tier ermöglicht die Umsetzung des 3R-Prinzips. Durch die Nutzung der Bildgebung ist es möglich, Versuchstiere im longitudinalen Verlauf wiederholt in vivo zu untersuchen. Auf Finalversuche bzw. das Töten der Tiere zu definierten Zeitpunkten zur Kontrolle der Versuchsentwicklung kann somit vielfach verzichtet werden, was die Anzahl an Versuchstieren deutlich reduziert (Reduction). Darüber hinaus sind diese Methoden der Bildgebung nicht mit Schmerzen verbunden (Refinement). Eine Narkose ist jedoch notwendig.

2. Literaturübersicht

2.1. Das Schwein als Versuchstier

Das Schwein (*Sus scrofa domestica*) ist die in Deutschland in der wissenschaftlichen Forschung am häufigsten eingesetzte Großtierspezies (14 374 Tiere, Stand 2014) [3]. Es zeichnet sich durch zahlreiche anatomisch-morphologische und physiologische Ähnlichkeiten zum Menschen aus [7-14]. Somit kann eine Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen auf den Menschen gewährleistet werden.

In der Humanmedizin wird das Schwein schwerpunktmäßig als Versuchstier zur Erforschung von Gefäß- und Herz-Kreislaufkrankungen eingesetzt. Darüber hinaus wird in den Teilbereichen Transplantationschirurgie, Diabetesforschung, Notfallchirurgie und in der Osteosyntheseforschung am Schwein geforscht [15].

Auch in der interventionellen Neuroradiologie hat das Schwein als Tiermodell einen hohen Stellenwert. Es wird beispielsweise zur Aneurysmaforschung [16, 17], zur Erprobung neuer Behandlungstechniken [13, 16] und zur Aus- und Weiterbildung von Ärzten [18] eingesetzt. Besonders aufgrund der Gefäßdiameter bietet das Schwein wesentliche Vorteile gegenüber kleineren Tierspezies, wie zum Beispiel dem Kaninchen [13]. So können die gleichen Materialien verwendet werden, die auch beim Menschen zum Einsatz kommen. Dies ermöglicht sowohl die Durchführung spezieller Versuchsvorhaben, als auch die Testung neu entwickelter Materialien (z. B. spezieller Katheter, Stents usw.).

Ein Nachteil des Schweins als Versuchstier gegenüber kleineren Tieren wie Maus und Ratte ist ein erhöhter Platzbedarf. Bei klassischen Rassen wie der Deutschen Landrasse können die relativ rasche Größen- und Gewichtszunahme der Tiere zudem die Durchführbarkeit longitudinaler Experimente beeinflussen und das Handling der Tiere erschweren. Je nach Aufbau und Dauer des Versuchs werden deshalb speziell gezüchtete kleine Schweinerassen, sog. Minipigs, aufgrund ihrer relativ stabilen Größe für longitudinale Studien eingesetzt. Besonders für die neurointerventionelle Forschung sind die konstanten Gefäßdurchmesser von Minipigs vorteilhaft [19]. Die in der medizinischen Forschung am häufigsten genutzten Zuchtlinien sind das Göttingen Minipig, das Hanford, Yukatan oder Sinclair Miniature Swine [7, 14, 20-22].

2.2. Arterielle Gefäßversorgung der Hintergliedmaße beim Schwein

Für jede diagnostische oder therapeutische Katheter-basierte Intervention ist ein arterieller Gefäßzugang notwendig. Die A. femoralis ist der am häufigsten gewählte arterielle Zugangsweg [23, 24]. Die Punktion erfolgt in Seldinger Technik (Abbildung 1) [25]. Zum besseren Verständnis des Zugangsweges sowie der Positionierung und Lage des in dieser Arbeit verwendeten Gefäßverschlusssystems wird an dieser Stelle die Anatomie der Arterien der Hintergliedmaße beim Schwein erläutert.

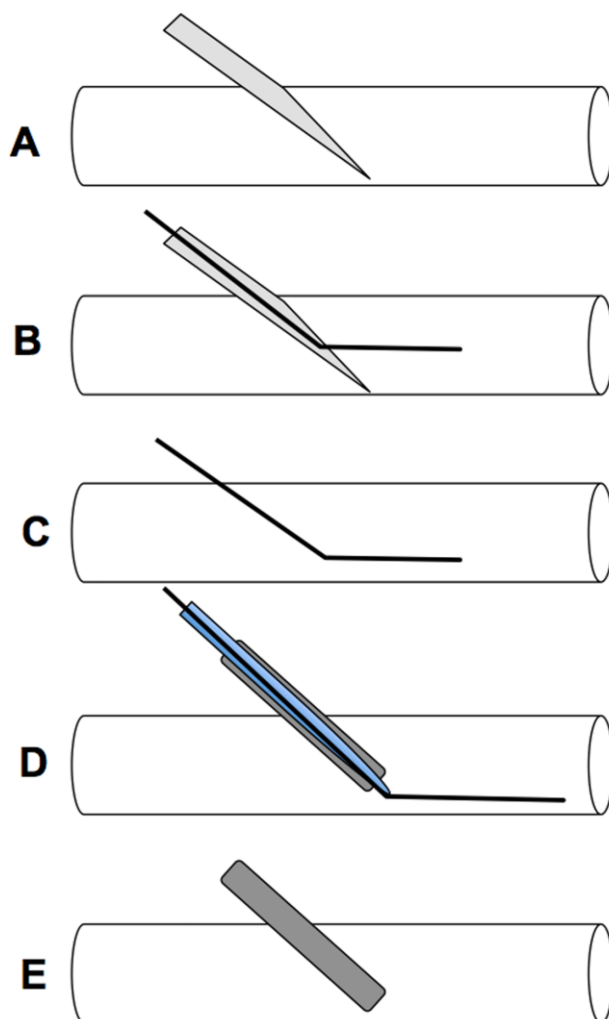


Abbildung 1: Die schematische Grafik zeigt die einzelnen Schritte bei der Punktion eines Gefäßes in Seldinger Technik. **A** Punktion des Gefäßes mit einer Punktionsnadel. Die Kanüle liegt mittig im Gefäßlumen. **B** Durch die Punktionsnadel wird ein Führungsdraht in das Gefäßlumen vorgeschoben. **C** Die Punktionsnadel wird zurückgezogen und entfernt. Der Führungsdraht verbleibt im Gefäßlumen. **D** Die Katheterschleuse mit Dilatator wird über den Führungsdraht im Gefäßlumen platziert. **E** Der Führungsdraht und der Dilatator werden entfernt. Die Katheterschleuse verbleibt im Gefäß.

Der Ursprung der arteriellen Gefäßversorgung der Hintergliedmaße (Abbildung 2) ist die A. iliaca externa, die beim Schwein bilateral in Höhe des 4. bis 5. Lendenwirbels aus der Teilungstelle der Aorta abdominalis hervorgeht.

2.3. Vaskuläre Verschlusssysteme

Nach erfolgter Intervention muss ein sicherer und möglichst schneller Verschluss der Punktionsstelle gewährleistet werden. Beim Menschen wird dies üblicherweise durch manuelle Kompression der Punktionsstelle mit anschließendem Anlegen eines Druckverbandes und temporärer 6–8 stündiger Immobilisation des Patienten [24, 28, 29].

Vaskuläre Verschlusssysteme (VCD) wurden in den 1990er Jahren entwickelt, um einen schnelleren und effizienteren Verschluss der Punktionsstelle auch unter gerinnungshemmender Therapie mit möglichst geringen Komplikationsraten zu ermöglichen [29-31]. Auf diese Weise sollten nicht nur ein höherer Patientenkomfort, sondern auch personelle und kostentechnische Vorteile (z. B. durch kürzere Liegezeiten der Patienten, geringere Komplikationsraten) erreicht werden. Inzwischen wurden verschiedene VCDs mit unterschiedlichen Funktionsweisen etabliert. Es kann zwischen aktiven und passiven Verschlusssystemen unterschieden werden [28, 32].

Zu den aktiven Verschlusssystemen (Verschlusssysteme im engeren Sinn) zählen VCDs, die zu einer kürzeren Zeitspanne bis zur Hämostase und somit einem schnelleren Verschluss der Punktionsstelle führen [32]. Es existieren VCDs, deren Wirkung auf einem a.) Nahtsystem (Perclose, Abbott Vascular, Santa Clara, USA), b.) Nitinolclip (StarClose, Abbott Vascular, Redwood City, USA), c.) extravaskulärem Verschluss (Exoseal, Cordis, Roden, Niederlande) oder d.) Gefäßanker in Kombination mit Kollagen (Angio-Seal vascular closure device, St. Jude Medical, St. Paul, USA) beruhen [28, 32, 33].

Im Vergleich zu aktiven Verschlusssystemen unterstützen oder verstärken passive VCDs die durch manuelle Kompression hervorgerufene Hämostase [32, 33]. Hierzu zählen beispielsweise thrombogen wirksame Tupfer oder Kompressionsgeräte (z. B. FemoStop, St. Jude Medical, St. Paul, MN, USA). Diese Art des Verschlusssystems wird meist nur temporär angewendet, bis sich ein Verschluss der Punktionsstelle entwickelt hat [28].

Zu den möglichen Komplikationen nach Einsatz eines VCDs zählen u.a. lokale Infektionen der Punktionsstelle, Pseudoaneurysmen, AV-Fisteln, Blutungen und Thrombosen bzw. Verschluss der A. femoralis mit distaler Ischämie [30, 34-37]. Die

Angaben in der Literatur zu der Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Komplikation schwanken und sind darüber hinaus abhängig von der Art des VCD [36, 38, 39].

2.3.1. Angio-Seal Vascular Closure Device

Das Angio-Seal vascular closure device ist eines der am häufigsten verwendeten VCDs [38, 40]. Es ist in den Größen 6 F und 8 F erhältlich, wobei das 6 F-System auch für den Verschluss von 7 F-Zugängen und das 8 F-System auch für den Verschluss von 9 F-Zugängen zugelassen ist. Das Angio-Seal VCD besteht aus drei vollständig resorbierbaren Komponenten: einem Anker aus Polylactid und Polyglycolsäure, einem Schwamm aus bovinem Kollagen und einem Polyglycolsäurefaden [41, 42]. Laut Herstellerangaben beträgt die Zeitspanne bis zur vollständigen Resorption aller Verschlusskomponenten 90 Tage [43, 44].

Das Angio-Seal VCD zählt zu den aktiven Verschlussystemen. Die Funktionsweise beruht auf der Kompression der Punktionsstelle durch Anwendung der sogenannten „Sandwich-Technik“ (Abbildung 3) in Kombination mit einer Hämostaseinduktion, vermittelt durch einen Kollagenschwamm [45, 46].

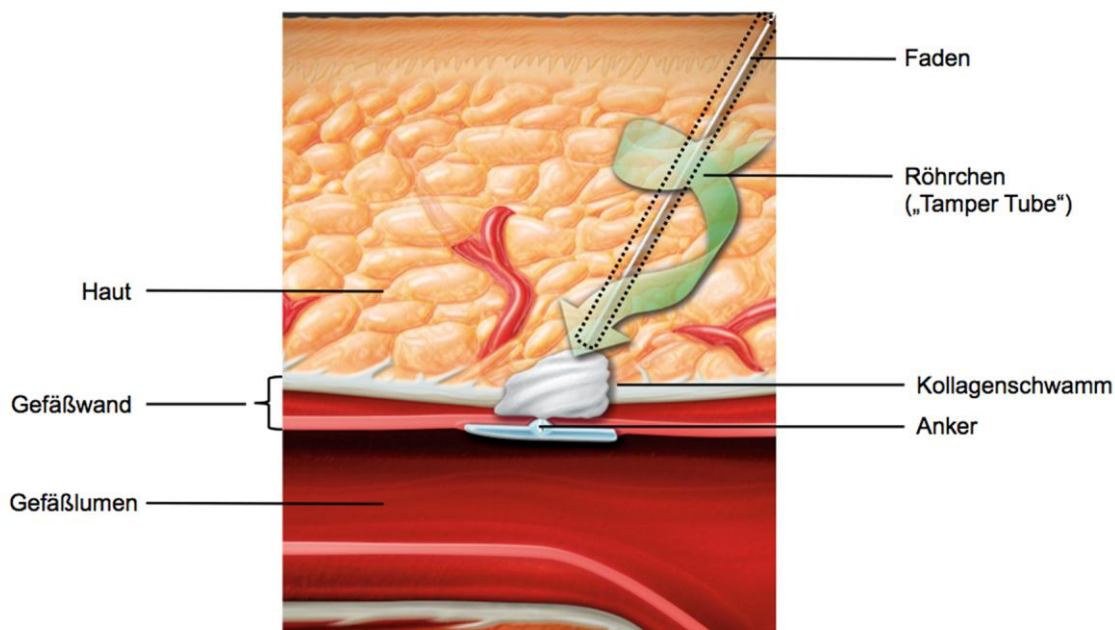


Abbildung 3: Modifizierte schematische Darstellung des Gefäßverschlusses mithilfe des Angio-Seal VCD: Durch Zug am Faden und gleichzeitigen Gegendruck mithilfe eines

Röhrchens (sog. „Tamper Tube“) wird die Gefäßwand zwischen intravasal positioniertem Anker und extravasal gelegenen Kollagenschwamm komprimiert und die Punktionsstelle verschlossen („Sandwich-Technik“) [47].

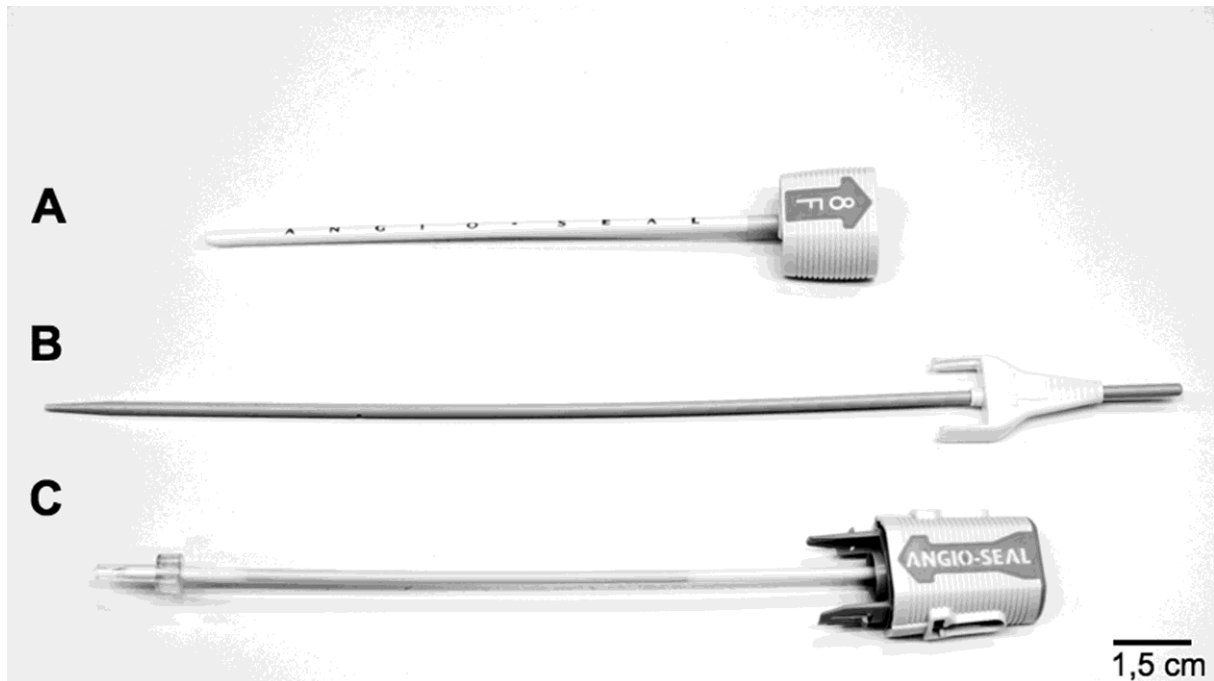


Abbildung 4: Übersicht der einzelnen Bestandteile des Angio-Seal VCD. **A** Katheterschleuse. **B** Arteriotomie-Lokator. **C** Verschlusssteil.

Der Verschluss der Punktionsstelle mithilfe des Angio-Seal VCD verläuft in drei Schritten [48]:

1. Einführen des Angio-Seal VCD

Durch die bereits für die Intervention verwendete Schleuse wird ein zum VCD gehöriger Führungsdraht in die A. femoralis eingeführt. Die Schleuse wird bei liegendem Führungsdraht entfernt. Die Arteriotomie-Lokator/Katheterschleuseneinheit (Abbildung 4) des VCD wird auf den im Gefäß liegenden Führungsdraht gefädelt und über diesen in die Arterie eingeführt. Wenn die Katheterschleuse 1,5 cm in die Arterie vorgeschoben wurde, tritt am Tropfloch des Lokators Blut aus. Dies signalisiert die intravasale Lage der Katheterschleuse. Die gesamte Arteriotomie-Lokator/Katheterschleuseneinheit wird langsam zurückgezogen, bis der Blutaustritt versiegt. Um die endgültige korrekte Position zu

erreichen, muss die Einheit abermals vorgeschoben werden, bis am Tropfloch erneut Blut austritt. Ohne die Position noch einmal zu verändern, werden der Arteriotomie-Lokator und der Führungsdraht entfernt, sodass nur die Katheterschleuse im Gefäßlumen verbleibt.

2. Positionierung des Ankers

Der eigentliche Verschlussteil (beinhaltet Anker und Kollagenschwamm, Abbildung 4 und 5) wird mit dem Bypass Tube voran in die Einführschleuse vorgeführt, bis Katheterschleusenkappe und -manschette hörbar ineinander einrasten. Die intravasale Position des Ankers ist somit erreicht. Das VCD wird langsam zurückgezogen, wobei die Einführschleuse fixiert wird, um eine Dislokation zu verhindern. Der Anker wird auf diese Weise an die Innenseite der Gefäßwand gezogen (Abbildung 3). Eine farbige Markierung an der Katheterschleusenkappe signalisiert die korrekte Position des Ankers.

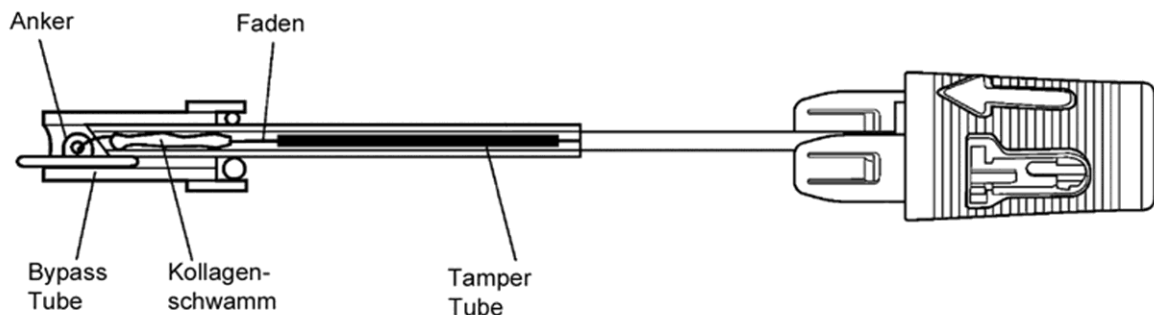


Abbildung 5: Modifizierte schematische Darstellung des Verschlussteils des Angio-Seal VCD [48].

3. Vorschub des Kollagenschwamms

Das Angio-Seal wird inklusive der Einführschleuse vorsichtig zurückgezogen. Die Einführschleuse wird vollständig aus Gefäß und Haut entfernt. Mithilfe eines Röhrchens (sog. „Tampor Tube“) kann der Kollagen-schwamm entlang des Fadens gegen die extravasale Gefäßwand gedrückt werden (Abbildung 3). Eine kontinuierliche Fadenspannung ist notwendig, um ein Dislozieren des

Kollagenschwamms zu vermeiden. Zuletzt wird der Faden unterhalb der Haut abgeschnitten.

Die Verwendung des Angio-Seal VCD bietet gegenüber der manuellen Kompression der Punktionsstelle wesentliche Vorteile. Verglichen mit einer Dauer von 15–20 Minuten bei manueller Kompression, kann mithilfe des Angio-Seals eine Reduktion der Hämostasezeit auf durchschnittlich unter 5 Minuten erreicht werden [42, 46, 49, 50]. Die Anwendung des Angio-Seal selbst dauert weniger als 2 Minuten [51].

Nach Einsatz einer 5 F Schleuse beträgt die minimale Immobilisationszeit des Patienten nach manueller Kompression 4 h, bei größeren Schleusen mindestens 6 Stunden [42]. Durch das Angio-Seal kann diese Zeit signifikant reduziert werden, laut Literatur bei einem Angio-Seal der Größe 6 F auf 1 Stunde [42, 49]. Dies führt zu einem gesteigerten Patientenkomfort [49].

Gemäß den Literaturangaben liegt die Komplikationsrate bei manueller Kompression in Abhängigkeit von Schleusengröße, Art des Eingriffs und Antikoagulation bei 1–17 % [52, 53]. Zahlreiche Studien belegen bei Verwendung des Angio-Seal VCD niedrigere Gesamtkomplikationsraten zwischen 0–3,6 % [42, 52–55]. Es kann zwischen Minor- und Majorkomplikationen unterschieden werden. Zu den Minorkomplikationen zählen nicht transfusionsbedürftige Blutungen, Hämatome mit einem Durchmesser ≤ 5 cm, Schmerzen an der Punktionsstelle sowie allergische Hautreaktionen [51, 56]. Hämatome mit einem Durchmesser > 5 cm, Pseudoaneurysmen, Okklusionen und Stenosen der A. femoralis, AV-Fisteln, Infektionen der Leiste, retroperitoneale Blutungen sowie Blutungen, die eine Bluttransfusion erfordern, werden als Majorkomplikationen bezeichnet [34, 51, 53].

Es existieren jedoch auch Nachteile des Angio-Seal VCD gegenüber der manuellen Kompression. Das Angio-Seal ist nicht geeignet für Gefäßdiameter < 4 mm [48]. Sollte innerhalb der ersten 90 Tage nach Einsetzen eines Angio-Seals eine Repunktion der Arterie notwendig sein, ist zuvor ein Angiogramm und ein Mindestabstand von 1 cm zu der vorherigen Punktionsstelle notwendig [43].

2.3.2. Vaskuläre Verschlusssysteme im Tiermodell

Longitudinale endovaskuläre Studien erfordern nicht selten einen wiederholten Gefäßzugang über die A. femoralis. Der Verschluss der Punktionsstelle durch manuelle Kompression und Anlegen eines temporären Druckverbands gestaltet sich beim Schwein äußerst schwierig. Durch ihre Lage im Canalis femoralis zwischen den stark entwickelten Mm. adductores ist die A. femoralis nur bei jungen Schweinen palpatorisch zugänglich [57]. Zudem würde ein Druckverband von dem Tier nach Erwachen aus der Narkose nicht toleriert werden. Auch eine länger andauernde Immobilisation, wie sie bei humanen Patienten nach manueller Kompression der Punktionsstelle erfolgt, ist bei Tieren nicht praktikabel.

Bei den meisten longitudinalen endovaskulären Studien wird eine duale Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel durchgeführt. Durch den zeitgleichen Einsatz eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums (NSAID; ASS) und eines Adenosindiphosphatrezeptor (ADP-Rezeptor)-Antagonisten (Clopidogrel) werden die Thrombozyten auf zwei unterschiedlichen Wegen gehemmt (duale Plättchenhemmung) [58]. Dadurch ergibt sich eine erhöhte Blutungsneigung der medizierten Tiere. Bei dem Verschluss der Punktionsstelle ist daher besondere Sorgfalt geboten, um postinterventionell hämorrhagische Komplikationen zu vermeiden.

VCDs erscheinen aufgrund ihrer schnellen Hämostaseinduktion für den Verschluss einer Punktionsstelle im Tiermodell geeignet. Bislang gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen bezüglich ihrer Anwendung beim Schwein [59-61]. Langzeituntersuchungen zum Einsatz von VCDs im Minipig fehlen.

2.4. Bedeutung bildgebender Methoden für tierexperimentelle Studien

Es stehen verschiedene Techniken zur Bildgebung beim Tier zu Verfügung. Die Auswahl reicht von der Sonographie über die Magnetresonanztomographie (MRT) bis hin zu Methoden, die auf Röntgenstrahlung basieren (konventionelles Röntgen, Computertomographie (CT), digitale Subtraktionsangiographie (DSA)). Speziell für die Untersuchung kleiner Versuchstiere (Maus und Ratte) sind sog. Mikro-CTs entwickelt worden. Auch optische Verfahren wie die Biolumineszenz (BLI) und

nuklearmedizinische Methoden (Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT)) können heute im Rahmen der tierexperimentellen Forschung genutzt werden.

Bildgebende Methoden ermöglichen eine wiederholte Untersuchung von Versuchstieren in vivo, sodass inzwischen häufiger auf Finalversuche oder eine terminierte Tötung der Tiere zwecks Verlaufskontrolle zu definierten Zeitpunkten verzichtet werden kann. Die notwendige Anzahl an Versuchstieren kann somit verringert werden. Auf diese Weise trägt die Anwendung bildgebender Techniken maßgeblich zu einer effektiven Umsetzung des 3R-Prinzips bei.

An dieser Stelle soll speziell auf die im Rahmen dieser Dissertation angewendeten Bildgebungsmethoden Computertomographie, Computertomographie-Angiographie, digitale Subtraktionsangiographie und molekularer Ultraschall eingegangen werden.

2.4.1. Computertomographie

Die Computertomographie ist eine auf Röntgenstrahlung basierende Schnittbildtechnik [62]. Die Röntgenstrahlungsabsorption beim Durchdringen verschiedener Gewebe kann mit dieser Methode ermittelt werden [63]. Ein Computertomograph besteht aus einer Röntgenröhre als Strahlungsquelle und Röntgendetektoren. Beide Elemente befinden sich in der sog. Gantry. Das zu untersuchende Objekt wird auf einem speziellen Tisch platziert, welcher durch die Gantry geschoben werden kann. Computersysteme sind weitere Bestandteile eines Computertomographen. Sie dienen zum einen der Bedienung des Computertomographen und zum anderen der nach einer Messung notwendigen Bildrekonstruktion [64]. Als erster Schritt einer CT-Untersuchung findet der Messvorgang statt. Hierbei erzeugt die Röntgenröhre in Einzelbewegungen (Translations-Rotations-Prinzip, Geräte der 1. und 2. Generation) oder in einer 360° Rotation (kontinuierliche Rotation, Geräte der 3. und 4. Generation) Röntgenstrahlen (Primärstrahlen), die in das Untersuchungsobjekt eindringen [65]. Die aus dem Objekt austretenden Strahlen werden als zweidimensionale Projektionen auf den Detektoren abgebildet. Auf diese Weise werden die Dichtewerte der durchdrungenen Gewebe bzw. die Abschwächung der Primärstrahlen (Abschwächungskoeffizient) in verschiedenen Projektionen ermittelt [62, 64]. Die Dichte eines Gewebes im CT wird

in Hounsfield-Einheiten (HE) angegeben [64, 65]. Jedem Dichtewert wird eine entsprechende Graustufe zugeordnet [64]. Im Anschluss erfolgt aus den 2D-Projektionen die computergestützte Rekonstruktion eines dreidimensionalen Datensatzes [66].

2.4.2. Computertomographie-Angiographie

Die Computertomographie-Angiographie ist eine Technik zur Gefäßdarstellung mithilfe von Röntgenstrahlung und Kontrastmittel (KM) [67]. Sie dient der Diagnose verschiedener Gefäßpathologien (z. B. Stenosen, Okklusionen, Verkalkungen, Dissektionen, Aneurysmen etc.) [64, 68]. Es wird v. a. nichtionisches, niedermolekulares KM mit Jodkonzentrationen von 250–370 mg Jod/ml eingesetzt. Dieses wird i.d.R. über einen venösen Gefäßzugang mithilfe von sog. Hochdruckinjektoren injiziert. Diese Art der Injektion ist notwendig, um durch hohe Injektionsrate eine hohe Konzentration des KM im Blut und damit einen optimalen Kontrast der Gefäße zu erreichen [69]. Durch die Verteilung des KMs ist eine Beurteilung sowohl der Arterien (arterielle Phase) als auch der Venen (venöse Phase) möglich [64, 70]. Wichtige Kriterien bei der Durchführung einer CTA sind die Intensität und Konstanz der Gefäßkontrastierung. Ziel ist es, eine homogene arterielle Gefäßdicke von mindestens 250 HE während der gesamten Messdauer zu erreichen. Eine venöse Überlagerung sollte bei Untersuchung arterieller Gefäße vermieden werden [64, 67]. Physiologische und technische Faktoren beeinflussen die Intensität und den Zeitpunkt der maximalen arteriellen Kontrastierung [64]. Das Herzminutenvolumen ist der bedeutendste physiologische Faktor. Technische Aspekte sind die Injektionsgeschwindigkeit des KM (ml/s) und die Jodkonzentration (mg/ml). Aus diesen beiden Parametern ergibt sich die Jodflussrate (g Jod/s). Die empfohlene Jodflussrate beim Menschen liegt bei 1,2–2,0 g Jod/s. Durch Variationen der beiden Ausgangsparameter kann die Jodflussrate verändert werden. Durch eine nachgeschaltete Injektion einer Natrium-Chlorid (NaCl)-Lösung kann die arterielle Kontrastierung zusätzlich erhöht und verlängert werden [64], da auf diese Weise die Wassersäule den applizierten KM-Bolus vor sich schiebt und dieser komprimiert bleibt.

Die CTA gilt als wenig invasives Verfahren [69]. Ihr Vorteil liegt in der guten Beurteilbarkeit des Gefäßlumens [71]. Durch die verschiedenen Möglichkeiten der Bildnachbearbeitung ist es möglich, zwei- und dreidimensionale Rekonstruktionen der Gefäße zu erstellen [67, 69, 72]. Nachteilig ist, neben einer Strahlenexposition, die Notwendigkeit der KM-applikation sowie die schlechtere Darstellung kleiner, peripherer Gefäße im Vergleich zur DSA [64, 71].

2.4.3. Digitale Subtraktionsangiographie

Die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) ist eine weitere Methode zur Darstellung von Gefäßen mittels Röntgenstrahlung und KM [73]. Bei dieser Technik wird dem Patienten über einen im zu untersuchenden arteriellen Gefäßgebiet liegenden Katheter KM injiziert [66]. Vor der Anflutung des KM werden Bildsequenzen, die als sog. Maske fungieren, aufgezeichnet. Während der Anflutung des KM werden ebenfalls Sequenzen aufgenommen, von denen die zuvor erstellte Maske subtrahiert wird. Unerwünschte Bildelemente (z. B. Knochen) werden auf diese Weise entfernt. Übrig bleiben allein die mit KM gefüllten Bildstrukturen, also die Gefäße [66, 73, 74]. Durch die Aufnahme mehrerer zeitlich aufeinander folgender Bildsequenzen kann die zeitliche und räumliche Verteilung des KM nachvollzogen werden [75].

Wesentliche Vorteile der DSA sind die hohe räumliche Auflösung, die schnelle Datenverarbeitung und die überlagerungsfreie Darstellung auch kleiner Gefäße [73, 74, 76]. Aus der Verteilung des KM können Rückschlüsse auf die dynamischen Blutflussverhältnisse innerhalb des untersuchten Gefäßgebiets gezogen werden [76]. Aufgrund dieser Vorteile ist die DSA die bildgebende Methode der Wahl bei bestimmten klinischen Fragestellungen [76, 77]. Neben der Diagnostik bildet die DSA die Grundlage für minimalinvasive endovaskuläre Interventionen [78]. Die Nachteile sind, wie bei der CTA, die Belastung des Patienten durch Röntgenstrahlung sowie die Injektion von KM. Anders als die CTA handelt es sich bei der DSA um eine invasive Methode, welche die Verwendung eines Katheters notwendig macht [73, 76].

2.4.4. Sonographie und molekularer Ultraschall

Unter dem Begriff Ultraschall versteht man Schallwellen mit Frequenzen > 20.000 Hz. Diese sind für das menschliche Gehör nicht wahrnehmbar [79]. Die Sonographie ist die klinische Anwendung des Ultraschalls, bei der man die Reflexion der Ultraschallwellen an Grenzflächen zur Beurteilung von Geweben und Organen nutzt [79]. In der Literatur wird der Begriff Ultraschall häufig als Synonym für die Sonographie benutzt.

Bei der Sonographie werden durch das Anlegen einer elektrischen Spannung Kristalle innerhalb des Ultraschallkopfes in Schwingung versetzt (indirekter Piezoeffekt). Diese Schwingungen führen zur Entstehung und Ausbreitung von Ultraschallwellen in dem jeweiligen Ausbreitungsmedium (z.B. Gewebe, Flüssigkeit) [79, 80]. Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um Longitudinalwellen [81]. Ein Teil der Ultraschallwellen wird beim Durchdringen des Mediums reflektiert und trifft wiederum auf die Kristalle des Ultraschallkopfes, wodurch erneut eine Spannung entsteht (direkter Piezoeffekt). Das Ultraschallgerät wandelt die elektrischen Signale in Bildpunkte unterschiedlicher Graustufen um (Impuls-Echo-Prinzip). Stark reflektierende (= echoreich) Medien werden hell dargestellt (z.B. Knochen), während Medien ohne Reflexion (= echofrei) schwarz erscheinen (z.B. Urin, Liquor). Verschiedene Gewebe und Strukturen werden bei der Sonographie folglich anhand des unterschiedlichen Ausmaßes ihrer Reflexion (= Echogenität) unterschieden. Von der zeitlichen Dauer zwischen Senden der Ultraschallwellen und Eintreffen des Echos kann auf die Gewebetiefe, also die Entfernung des reflektierenden Gewebes zum Ultraschallkopf, geschlossen werden [79, 80, 82, 83]. Wichtige Kenngrößen der Sonographie sind Amplitude, Frequenz, Wellenlänge und Schallwellengeschwindigkeit [79]. Als Amplitude bezeichnet man die maximale Höhe einer Schwingung bzw. einer Schallwelle. Die Frequenz beschreibt die Anzahl an Schwingungen pro Zeiteinheit. Sie ist neben der Wellenlänge, welche als Abstand zwischen zwei Amplitudenmaxima definiert ist [81], ein entscheidender Aspekt für das Auflösungsvermögen. Je höher die Ultraschallfrequenz und je kürzer die Wellenlänge desto größer ist das Auflösungsvermögen und somit die Detailerkennbarkeit. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Ultraschallwellen ist

abhängig von dem zu durchdringenden Medium bzw. seiner Dichte. Je höher die Dichte eines Mediums, desto höher ist die Schallwellengeschwindigkeit [79-81, 84].

Die vom Ultraschallgerät umgewandelten elektrischen Signale können auf verschiedene Arten als Bild dargestellt werden. Möglichkeiten der Bilddarstellung sind beispielsweise der A-, B- und M-Mode sowie der 2D- Echtzeitmodus oder die Dopplersonographie. Das A-Mode-Verfahren (Amplitudenmodulation) ist das älteste und technisch einfachste aller Bildrekonstruktionsverfahren. Hierbei werden die Schallwellenechos eindimensional und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die angezeigte Amplitude entspricht der Echostärke. Diese Methode wird heute nur noch selten verwendet, z.B. zur Messung der Dicke der Hornhaut im Auge [79, 83, 84]. Bei dem B-Mode-Verfahren (Brightness-Modulation) werden die Schallwellenechos als einzelne Bildpunkte in unterschiedlichen Graustufen abgebildet. Jeder Amplitude wird dabei eine spezielle Graustufe zugeordnet. Dabei gilt, je stärker ein Schallwellenecho desto heller ist die Graustufe des einzelnen Bildpunktes [79, 83, 84]. Durch die Synchronisierung der Bilder des B-Mode-Verfahrens in Echtzeit entsteht die Bilddarstellung im 2D-Echtzeitmodus. Dies ist die heutzutage am häufigsten eingesetzte Ultraschallmethode [79]. Das M-Mode-Verfahren (time-motion-Modulation) dient der Darstellung von Bewegungsabläufen (z.B. der Herzklappen) und wird vorwiegend zur Echokardiographie genutzt. Die Schallwellenechos werden bei diesem Modus als Bildpunkte unterschiedlicher Graustufen an einem bestimmten Ort zu einem bestimmten Zeitpunkt wiedergegeben [79, 82]. Ebenfalls häufig in der Echokardiographie sowie zur Messung von Blutströmungen wird das Prinzip der Dopplersonographie, z.T. in Kombination mit einer Farbkodierung, angewendet [85-87].

Der molekulare Ultraschall ist eine Form der Bildgebung zum Nachweis intravasaler Zielmoleküle („Targets“) [88, 89]. Er basiert auf der Anwendung von nur wenigen Mikrometer großen, mit Gas gefüllten Kontrastmittelbläschen, den sog. Microbubbles (MB) [89]. Die MB werden bei dieser Methode in Schwingung versetzt, sorgen auf diese Weise für ein verstärktes Ultraschallsignal und fungieren als Kontrastmittel bei der Durchführung des Ultraschalls. Unterschiedliche Gase (z.B. Raumluft, Schwefelhexafluorid, Perfluorcarbone) können zur Füllung der Bläschen eingesetzt

werden. Die Hülle der MB besteht aus Phospholipiden, Proteinen oder Polymeren. Direkt an der Hülle oder über kovalente Bindungen können spezifische Liganden (z.B. Antikörper, Glykoproteine oder Peptide) an die MB gebunden werden [90-93]. Aufgrund ihrer Größe verbleiben die MB streng im vaskulären Kompartiment. Es können folglich nur Zielmoleküle innerhalb des Gefäßsystems mit dieser Methode sichtbar gemacht werden [91]. Der molekulare Ultraschall unter Verwendung von MB wird vor allem in der Onkologie zur Kontrolle der Neoangiogenese, in der Kardiologie sowie im Zusammenhang mit endovaskulären Entzündungsreaktionen und Thrombusbildung eingesetzt [90, 93, 94].

2.5. Ziel der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit des Angio-Seal VCD im Minipig im longitudinalen Verlauf zu untersuchen. In die Auswertung wurden, neben den Befunden verschiedener bildgebender Verfahren (CTA und DSA), auch die Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen von Arterien sowohl unbehandelter als auch behandelter Tiere (nach Einsatz eines Angio-Seal VCD) mit einbezogen.

Zusätzlich wurde die Methode des molekularen Ultraschalls unter Verwendung spezieller Poly-n-butylcyanoacrylat-Microbubbles, welche zielgerichtet an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden, auf ihre Eignung zum Monitoring des Heilungsprozesses einer Gefäßwandverletzung im Minipig untersucht.

Die Experimente wurden mit Genehmigung des zuständigen Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW und gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Tiere wurden in verschiedenen interventionellen Studien unabhängig von der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

3. Material und Methoden

3.1. Anwendung des Angio-Seal VCD

Für die vorliegende Arbeit wurde bei 8 weiblichen Minipigs (Ellegard Göttingen Minipigs A/S, Dalmose, Dänemark) mit einem Anfangsgewicht von 42 ± 8 kg ein Angio-Seal VCD zum Verschluss einer Punktionsstelle in die A. femoralis eingesetzt. Bei allen Tieren wurde vor der Applikation des Angio-Seal VCD der initiale Durchmesser der A. femoralis angiographisch ermittelt.

3.1.1. Anästhesie

Die Prämedikation der Tiere erfolgte mit Azaperon (Stresnil 40 mg ad. us. vet.; Sanochemia Pharmazeutika AG, Neufeld, Österreich), Atropin (Atropinsulfat, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Ketamin (10 % Ketavet ad us. vet., Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland). Anschließend erfolgte die Intubation. Die Narkose wurde durch die Gabe von Propofol (Propofol 2% MCT Fresenius; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) aufrechterhalten. Die Analgesie wurde durch eine kontinuierliche Verabreichung von Fentanyl (Fentanly-Janssen 0,5 mg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) sichergestellt.

3.1.2. Applikation des Angio-Seal VCD

Nach Punktion der A. femoralis wurde den Tieren ein Angio-Seal VCD in der Größe 6 F (n = 7) oder 8 F (n = 6) zum Verschluss der Punktionsstelle eingesetzt. Das Angio-Seal VCD wurde wie bereits unter 2.3.1. beschrieben gemäß den Herstellerangaben angewendet.

3.1.3. Medikation

Ab dem Tag des Einsatzes des Angio-Seal VCD wurden alle Tiere mit Acetylsalicylsäure (ASS) (Aspirin 450 mg/d (n = 7) oder 100 mg/d (n = 1); Bayer Vital

GmbH, Leverkusen, Deutschland) und Clopidogrel (Iscover, 75 mg/d (n = 8); Orifarm GmbH, Leverkusen, Deutschland) behandelt. Drei Tieren wurde einmalig 24 Stunden vor der Anwendung des Angio-Seal VCD eine Dosis von 450 mg Clopidogrel verabreicht. Während des interventionellen Eingriffs bekamen die Tiere 500 mg ASS und 3000 IU Heparin (Heparin-Natrium-5000; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) zur Prävention einer Thrombembolie.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der dualen Thrombozytenhemmung wurden Thrombozytenfunktionstests unter Verwendung des Multiplate-Analyzers (Dynabyte Medical, München, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Basis- und Kontrollwerte mithilfe des ASPI- und ADP- Tests ermittelt.

3.1.4. Kontrolluntersuchungen

Um die Auswirkungen des Angio-Seal VCD auf die porcinen Arterien zu überprüfen, wurden die Tiere narkotisiert (Propofol 2% MCT Fresenius; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und mithilfe von CTA und DSA untersucht.

Die Kontrolluntersuchungen per CTA (Somatom AS; Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) fanden nach 1 (n = 4), 2 (n = 4), 3 (n = 3), 4 (n = 6), 8 (n = 4) und 12 (n = 5) Wochen statt (Abbildung 6). Die Messparameter betrugen 100 ml KM (Solutrast 300, 300 mg Jod/ml; Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland) gefolgt von 30 ml NaCl-Lösung mit einer Flussrate von je 4 ml/s.

Die angiographischen Kontrollen (Axiom; Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) nach Punktion der kontralateralen Arterie erfolgten nach 1 (n = 1), 3 (n = 1), 4 (n = 3), 12 (n = 2), 21 (n = 2) und 22 (n = 4) Wochen (Abbildung 6). Eine Arterie wurde zweifach untersucht.

Nach der letzten Kontrolluntersuchung wurden die Tiere während der Narkose durch eine intravenöse Injektion von 0,5-1 ml/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Narcoren 16 g/100 ml; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

3.1.5. Auswertung

Zur Auswertung der DICOM-Daten wurde die public domain software OsiriX (www.osirix-viewer.com) verwendet. Die initialen und postinterventionellen Messwerte der Femoralarterien sowie die Dauer der Beobachtungszeiträume wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel Version 14.6.4) übertragen. Aus den erhobenen Daten wurden Diagramme und Abbildungen erstellt.

3.1.6. Histopathologische Untersuchung

Im Anschluss an die Euthanasie wurden behandelte (n = 13) und unbehandelte (n = 3) Femoralarterien präpariert, entnommen und in gepuffertem Formalin (4 %) fixiert.

Die Arterien von 2 Tieren (Euthanasie nach 4 bzw. 12 Wochen) wurden histopathologisch untersucht. Es wurde jeweils sowohl die mit dem Angio-Seal VCD behandelte als auch die kontralaterale, unbehandelte Arterie untersucht.

Nach der Fixierung mit Formalin wurden die Gefäße in Abschnitte von 0,4 cm Größe zerteilt. Die Teilstücke wurden in Paraffin eingebettet, als 5 µm dicke Schnitte auf Objektträgern fixiert und mit den Färbungen Hämatoxylin-Eosin (HE), Kongorot, Berliner Blau oder Van Gieson gefärbt. Es folgte die histopathologische Beurteilung (Zeiss Axio Scope.A1 microscope und AxioCam MRc camera; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) der Gewebeschnitte.

3.2. Molekularer Ultraschall

In der zweiten Arbeit dieser Dissertation wurden zur Durchführung des molekularen Ultraschalls im Schwein als Tiermodell 3 verschiedene Typen von Microbubbles (MB) eingesetzt: $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MB (cycloRGDfK), Integrin-unspezifische MB (cycloDRfGK) sowie unbeschichtete MB. Die beiden letztgenannten MB-Typen fungierten hierbei jeweils als Negativkontrolle. Die entsprechenden Peptidsequenzen wurden kovalent über aktivierte Carboxylgruppen an der Oberfläche der MB gebunden.

3.2.1. Evaluation der durch den Einsatz von Microbubbles bedingten Komplement-Aktivierung

In-vitro wurde eine mögliche durch den Einsatz der MB ausgelöste Serum-Komplement-Aktivierung mithilfe von Antikörper-sensibilisierten Schaferythrozyten evaluiert. Hierzu wurde die Anzahl an lysierten Antikörper-sensibilisierten Schaferythrozyten als Maß für die Komplement-Aktivierung verwendet.

In einem 30°C warmen Wasserbad wurden Schaferythrozyten (Oxoid, Hampshire, England) mit einem vom Kaninchen stammenden Anti-Schaf-Zell-Hämolyysin in einer Konzentration von 1,5 mg/ml bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten beschichtet. Serumproben von 5 verschiedenen Schweinen wurden für jeweils 1 Stunde bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen (3×10^7 MB/kg, 3×10^8 MB/kg, 3×10^9 MB/kg) der folgenden MB-Typen inkubiert: (1) $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MB (cycloRGDfK), (2) Integrin-unspezifische MB (cycloDRfGK, (3) unbeschichtete MB und (4) Phospholipid-MB. Zymosan A (Ursprung: *Saccharomyces cerevisiae*; Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) fungierte in einer Konzentration von 125 µg/ml als Positivkontrolle, Veronalpuffer (Lonza, Walkersville, USA) als Negativkontrolle. Nach der Inkubation wurden die Proben mit Veronalpuffer im Verhältnis 1:4 verdünnt und jeweils eine identische Menge an Antikörper-sensibilisierten Schaferythrozyten hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationsdauer von 30 Minuten bei 37°C. Zusätzlich wurden Erythrozyten mit destilliertem Wasser inkubiert, um die Menge an lysierten Zellen im Vergleich zur Inkubation mit Veronalpuffer zu ermitteln. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und zur Absorptionsmessung auf eine Mikrotiterplatte übertragen.

3.2.2. Evaluation der spezifischen Bindung von Microbubbles an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Die spezifische Bindung von MB an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wurde in vitro mit Hilfe humaner Endothelzellen der V. umbilicalis untersucht. Dazu wurden die Zellen in einem speziellen Medium (VascuLife Basal Medium in Kombination mit VascuLife EnGS LifeFactors Kit; LifeLine Cell Technology, Troisdorf, Deutschland) für 24 Stunden kultiviert. Zur Steigerung der Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wurden die Zellen 4

Stunden vor der Testung der MB mit Tumornekrosfaktor (TFN)- α (4ng/ml) stimuliert. Dreißig Minuten vor der Testung wurde die Zellmembran mit Weizenkeimagglutinin (Weizenkeimagglutinin AF488 Konjugat; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. Humane Endothelzellen und MB wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit Hilfe eines Laborschüttlers (Titramax 101; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) mit 150 rpm inkubiert. Die Zellkerne wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (4'-6 Diamidin-2-Phenylindol) angefärbt. Um die Anzahl an gebundenen MB auf der Zelloberfläche zu bestimmen, wurden mikroskopische Aufnahmen bei 20facher Vergrößerung angefertigt (Zeiss Axio Imager M; Carls Zeiss, Jena, Deutschland) und die gebundenen MB manuell gezählt.

3.2.3. In vivo Erzeugung einer Endothelverletzung

Für die in vivo Versuche wurden 6 Minipigs mit einem Anfangsgewicht zwischen 30 und 50 kg nach vorheriger Prämedikation mit 1 ml Atropin (1% Atropinsulfat; Köhler Chemie, Bensheim, Deutschland), 0,2 ml/kg Körpergewicht Azaperon (Stresnil; Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland), 0,1 ml/kg Körpergewicht Ketamin (Ketamin 10%; Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf, Deutschland) und Propofol (Propofol 2%; Pharmore, Ibbenbüren, Deutschland) intubiert. Die Narkose wurde mit einem Luft-Isfluran (2,0 vol %)-Gemisch aufrecht erhalten. Die Analgesie wurde durch eine kontinuierliche Verabreichung von Fentanyl (Fentanly; Rotexmedica, Trittau, Deutschland) sichergestellt. Um thrombembolische Komplikationen zu vermeiden, wurden die Tiere mit einer Anfangsdosierung („loading dose“) von 500 mg Acetylsalicylsäure (ASS) (Aspirin; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 450 mg Clopidogrel (Iscover; Orifarm GmbH, Leverkusen, Deutschland) behandelt. Nach der Intervention wurde die Thrombozyten hemmende Therapie mit 250 mg/d ASS und 75 mg/d Clopidogrel fortgesetzt.

Über einen Zugang über die A. femoralis wurde ein Katheter in die A. carotis communis eingeführt. Im mittleren zervikalen Segment der linken A. carotis communis wurde durch zweimalige Inflation eines Ballonkatheters (6 atm) für eine Dauer von 60 Sekunden eine Endothelverletzung herbeigeführt. Die rechte A. carotis communis wurde nicht behandelt, sondern diente als Kontrolle.

3.2.4. Analyse der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in porcinen Arterien mit molekularem Ultraschall

Für die Analyse der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in den porcinen Aa. carotis wurde das Ultraschallsystem Acuson X300 (Siemens AG, München, Deutschland) mit einem Linearschallkopf (VF8-3; Siemens AG, München, Deutschland) bei einer Frequenz von 5,2 MHz und einem mechanischen Index von 0,11 verwendet. Die weiteren Einstellungen waren wie folgt: laterale/axiale Auflösung 0,1 x 0,1 mm, Transitleistung 0,5%, Dynamikbereich 60 dB, Verstärkung 35 dB und Bildtiefe 2-3 cm.

Die MB wurden jeweils in einer Konzentration von 4×10^8 MB/kg Körpergewicht über einen venösen Zugang über die laterale Ohrvene injiziert. Zunächst wurden die unbeschichteten MB, gefolgt von den Integrin-unspezifischen MB und zuletzt die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen MB eingesetzt. Jeweils 8 Minuten nach der Injektion der MB wurde die entsprechende Lokalisation an der linken A. carotis communis mit Hilfe des Ultraschallgerätes im B-Mode untersucht. Anschließend wurden die MB durch die Anwendung des Doppler-Modus bei 100% Leistung für 10 Sekunden zerstört. Zwischen den Injektionen der einzelnen MB-Typen wurde jeweils eine Wartezeit von 15 Minuten eingehalten, um auszuschließen, dass noch verbliebene MB eines anderen Typs im Blut zirkulieren. Die rechte unverletzte A.carotis communis wurde ebenfalls untersucht.

Die Tiere wurden im longitudinalen Verlauf direkt nach der Endothelverletzung sowie nach 1 Woche, 5 Wochen, 3 und 6 Monaten untersucht.

3.2.5. Immunhistologische Analyse

Zusätzlich zu den Untersuchungen mittels molekularem Ultraschall wurden immunhistologische Analysen sowohl der verletzten als auch der gesunden A. carotis communis von jeweils einem Tier zu verschiedene Zeitpunkten (1 Woche, 5 Wochen und 3 Monate nach Erzeugung der Endothelverletzung) durchgeführt. Es wurden 8 μ m dicke Schnitte angefertigt, mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und mittels verschiedener Immunfluoreszenzfarbstoffe (Maus-anti-Schwein CD61- β_3 -Integrin (AbDSerotec, Puchheim, Deutschland), Cy3 Anti-Maus (Dianova, Hamburg, Deutschland) und 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (Merck, Darmstadt, Deutschland))

gefärbt. Es folgte die immunhistologische Beurteilung (Axio Imager M2 und Axio Vision; Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Untersuchungen zum Einsatz des Angio-Seal VCD im Minipig

Bei 8 Minipigs wurden insgesamt 13 Angio-Seal VCD in der Größe 6 F und 8 F eingesetzt. Fünf Tieren wurde bilateral, 3 Tieren unilateral nach einer Punktion der A. femoralis ein Angio-Seal VCD eingesetzt (Abbildung 5). In allen Fällen ($n = 13$) gelang der Einsatz in die jeweilige A. femoralis ohne technische Schwierigkeiten. Es traten keine postinterventionellen hämorrhagischen Komplikationen auf. Während der gesamten Versuchsdauer zeigte keines der Tiere Beeinträchtigungen wie Lahmheiten oder Schmerzen infolge der Applikation des Angio-Seal VCD.

Die Tiere wurden über einen mittleren Zeitraum von $14,1 \pm 8,0$ Wochen (1–22 Wochen) beobachtet (Abbildung 6). Die unterschiedlich langen Beobachtungszeiträume resultieren daraus, dass die Tiere in verschiedenen interventionellen Experimenten unabhängig von der vorliegenden Studie eingesetzt wurden.

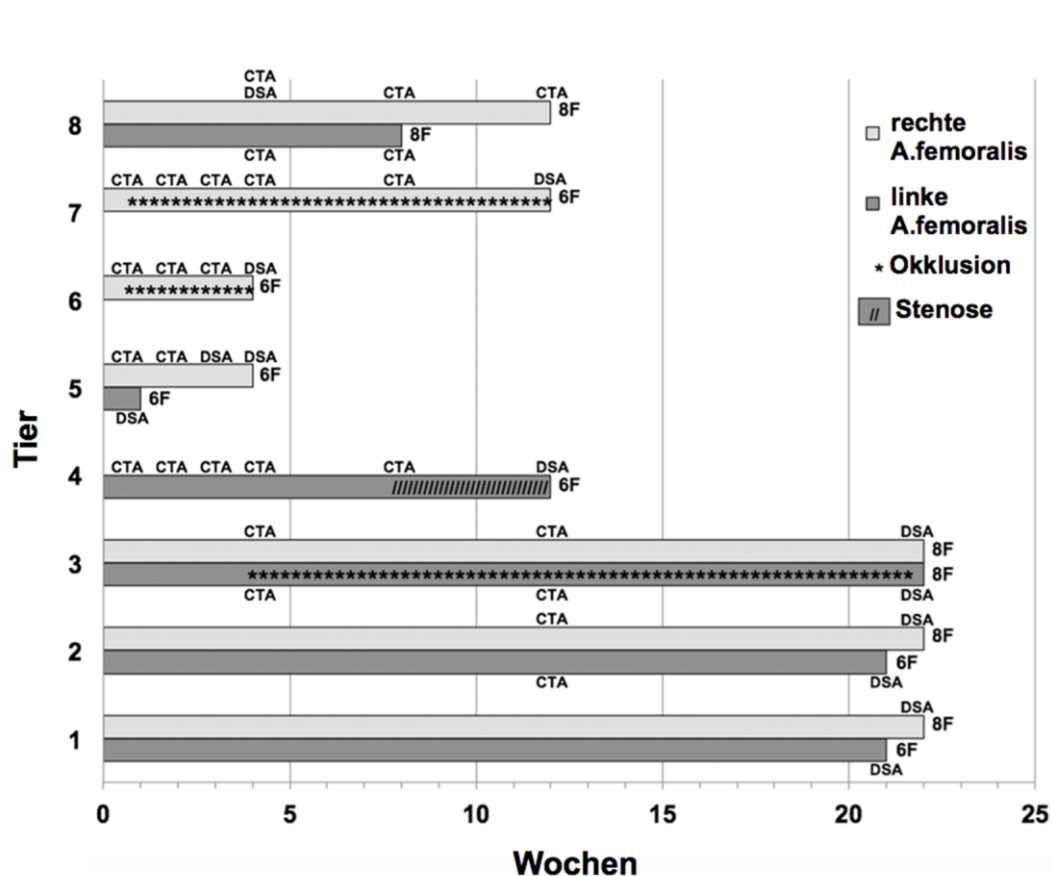


Abbildung 6: Überblick über die Anzahl der verwendeten Versuchstiere, die Dauer der Beobachtungszeiträume, die Untersuchungszeitpunkte und die jeweilige bildgebende Untersuchungsmethode sowie den Zustand der A. femoralis nach Applikation des Angio-Seal VCD.

4.1.1. Bildgebung

Der mittlere präinterventionelle Gefäßdiameter vor der Applikation des Angio-Seal VCD betrug $5,1 \pm 0,4$ mm. Die Messwerte der einzelnen Femoralarterien sind in Abbildung 7 dargestellt. Alle Gefäße wiesen mit einem Durchmesser von mehr als 4 mm (4,3–5,8 mm) eine den Herstellerangaben entsprechende Mindestgröße für die Anwendung des Angio-Seal VCD auf.

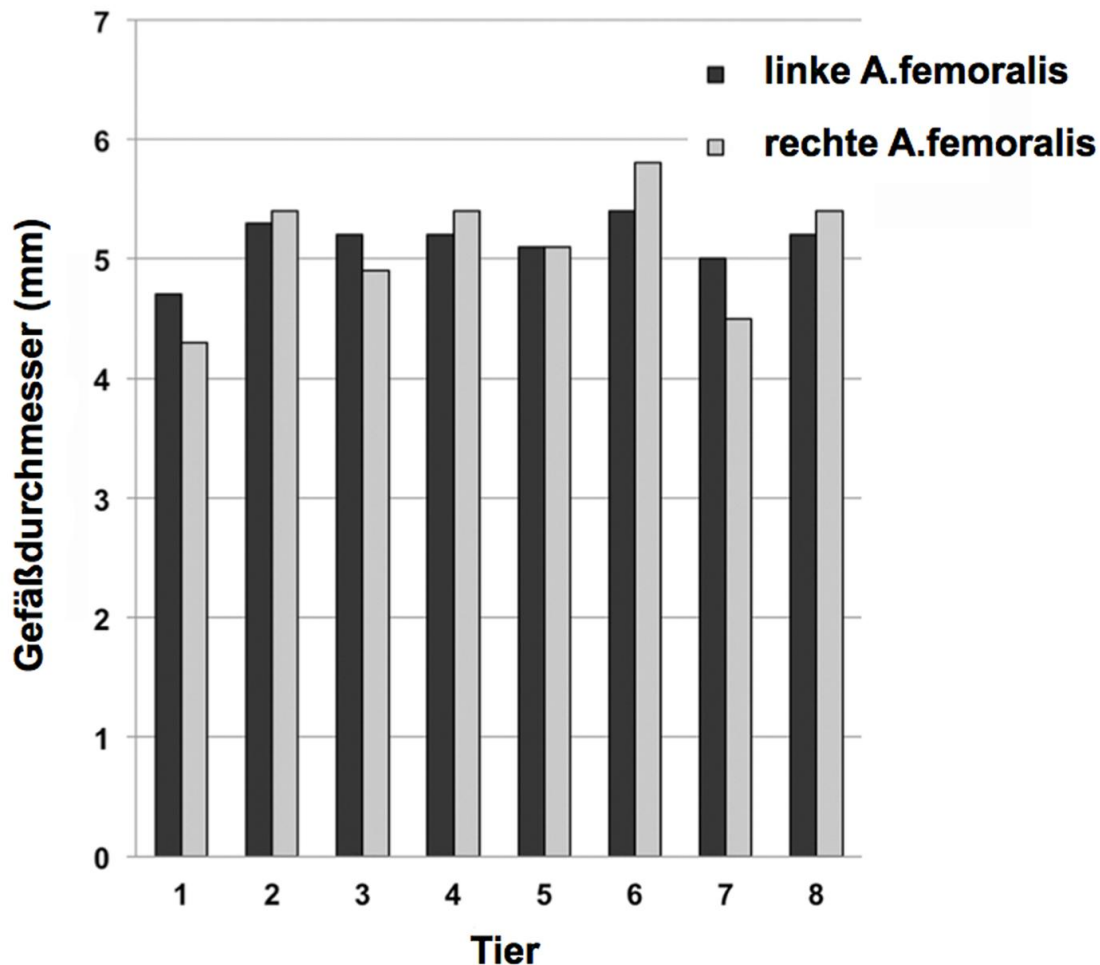


Abbildung 7: Präinterventionelle Durchmesser der A.femoralis.

Bei insgesamt 3 von 13 mit Angioseal versorgten Gefäßen wurde im Verlauf des Versuchs eine Okklusion sowohl per CTA, als auch angiographisch festgestellt (Abbildung 6). Bei einem dieser Tiere zeigte sich 4 Wochen nach Applikation eines 8 F Angio-Seal VCD ein Verschluss der linken A. femoralis (Abbildung 8). In den anderen beiden Fällen wurde jeweils 1 Woche nach Anwendung eines 6 F Angio-Seal VCD in der rechten A. femoralis eine Gefäßokklusion diagnostiziert. Alle 3 Arterien blieben bis zum Versuchsende nach 22, 12 bzw. 4 Wochen verschlossen. Keines der betroffenen Tiere zeigte durch den Gefäßverschluss bedingte Schmerzen oder Lahmheit. Daher wurde bei keinem der betroffenen Tiere der Versuch vorzeitig beendet.

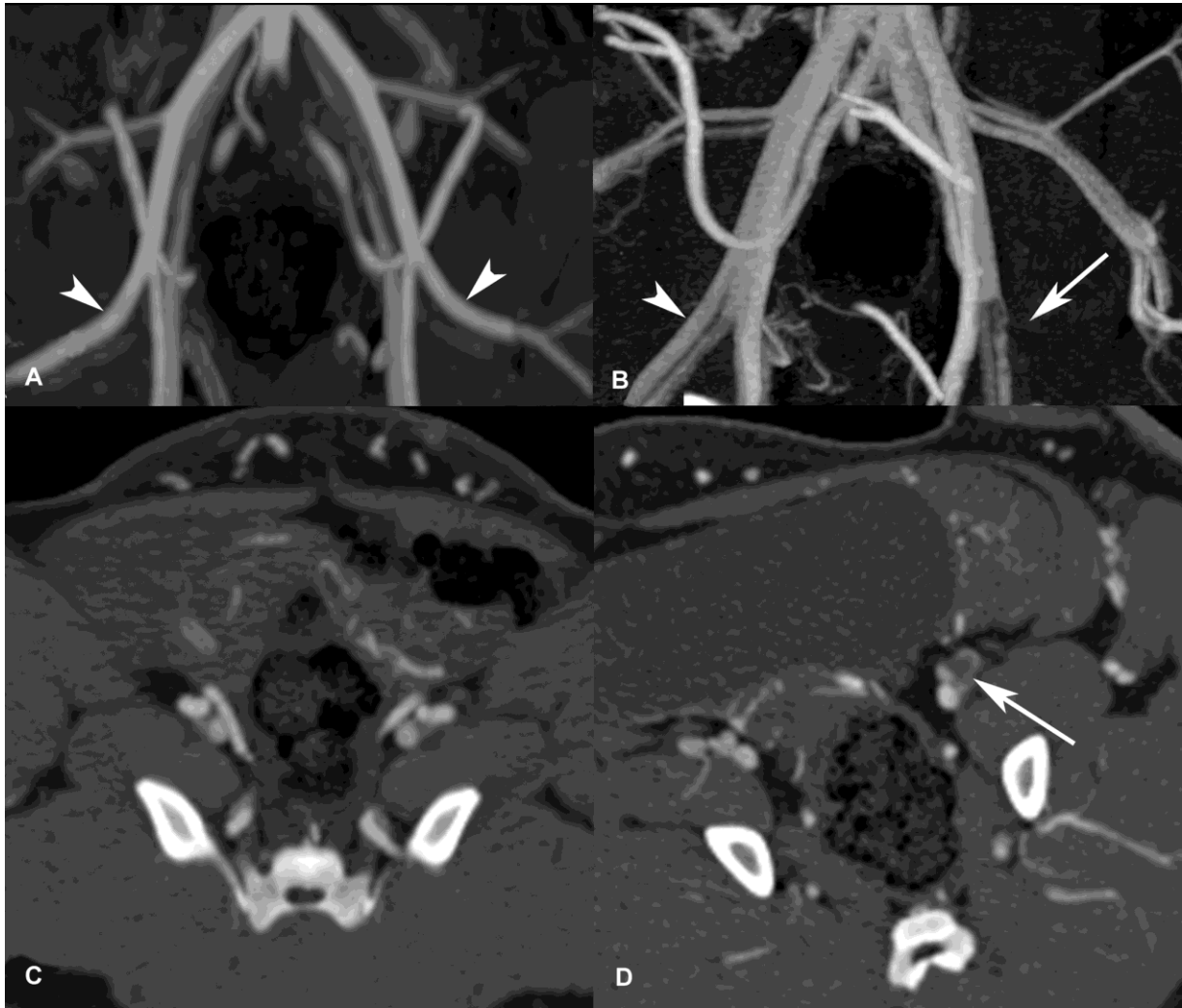


Abbildung 8: Okklusion der linken A. femoralis nach Applikation eines 8 F Angio-Seal VCD. (A,C) Die CTA zeigt die bds. intakten Femoralarterien vor dem Einsatz des Angio-Seal VCD (Pfeilspitzen in A). **(B,D)** Vier Wochen nach der Applikation eines 8 F Angio-Seal VCD in die linke A. femoralis ist die Gefäßokklusion deutlich in der CTA zu erkennen (Pfeil in B und D).

Acht Wochen nach der Applikation eines 6 F Angio-Seal VCD in die linke A. femoralis wurde bei einem Minipig eine 50 %ige Stenose festgestellt, die bis zum Ende des Versuchs nach 12 Wochen bestehen blieb (Abbildung 6 und 9). Das Tier zeigte keine Beeinträchtigungen aufgrund des Befundes.

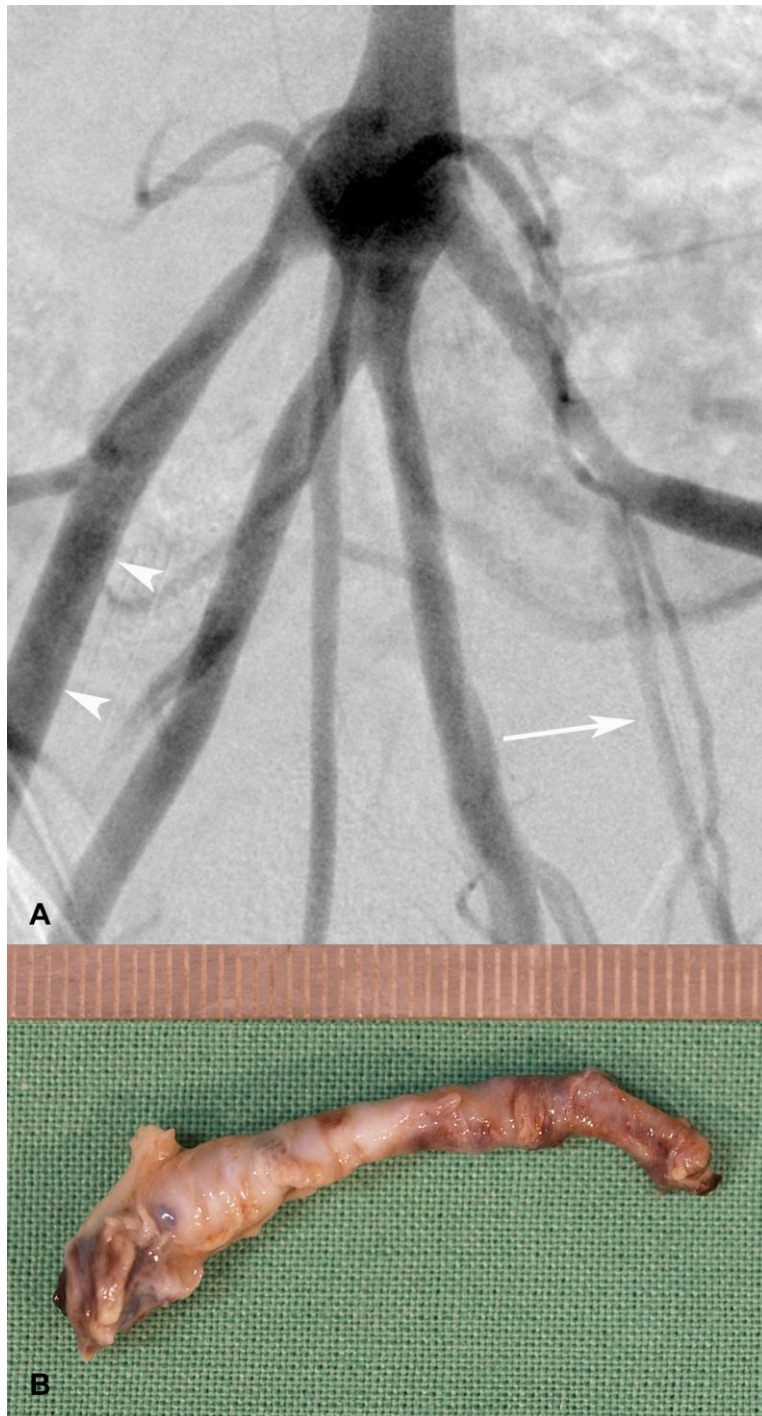


Abbildung 9: (A) Die DSA zeigt die lokale Stenose der linken A. femoralis nach Einsatz eines 6 F Angio-Seal VCD (Pfeil). Die kontralaterale, unbehandelte Seite ist in einem physiologischen Zustand (Pfeilspitzen). (B) Das makroskopische Bild der präparierten linken A. femoralis zeigt das pathologisch verdickte Gefäßsegment an der Applikationsstelle des Angio-Seal VCD.

In den übrigen 69,2 % (n = 9) konnten keine Angio-Seal-bedingten Gefäßveränderungen nachgewiesen werden.

4.1.2. Histopathologie

Es wurden zwei der nach Einsatz eines Angio-Seal VCD okkludierten Femoralarterien (Tier 6 und 7) inkl. der kontralateralen, unbehandelten Arterien histopathologisch untersucht. Die Applikation des Angio-Seal VCD lag zum Zeitpunkt der Gewebepräparation 4 bzw. 12 Wochen zurück.

Die unbehandelten Femoralarterien (n = 2) beider Tiere waren in einem physiologischen Zustand. Die mit einem Angio-Seal VCD behandelten Arterien (n = 2) zeigten eine Obliteration des Gefäßlumens (Abbildung 10). In der Intima, fokal auch im Bereich der Media, zeigte sich eine exzessive Bildung von kollagenem Gewebe. Die Präsenz von Histiozyten, Lymphozyten und einzelner eosinophiler Granulozyten um ein polymeres Material herum, deutet auf eine Fremdkörperreaktion hin. An einigen Stellen war die Lamina elastica interna fragmentiert. Angrenzend an die Media fanden sich Reste von elastischem Material innerhalb von fibrotischem Gewebe. Das neugebildete Gewebe füllt den Bereich des ehemaligen Gefäßlumens aus. Innerhalb dieser Gewebemasse konnten Hämosiderinablagerungen festgestellt werden. Dies deutet auf ein Hämatom hin.

Vier Wochen nach Applikation des Angio-Seal VCD (Tier 6) erkennt man im Bereich des ehemaligen Gefäßlumens bis zu 15 µm messende blass eosinophile Corpusculi (Abbildung 10 D). Dieses kongophile, doppelbrechende Fremdkörpermateriale scheint das Residuum der intraluminalen Komponente des Angio-Seal VCD zu sein. Es ist umgeben von Granulationsgewebe, welches vorwiegend aus mehrkernigen Histiozyten besteht. Zusätzlich finden sich vereinzelt Lymphozyten und eosinophile Granulozyten. Insgesamt deutet dies auf einen unvollständigen Abbau der intraluminalen Bestandteile des Angio-Seal VCD mit Entwicklung einer chronischen Entzündungsreaktion hin.

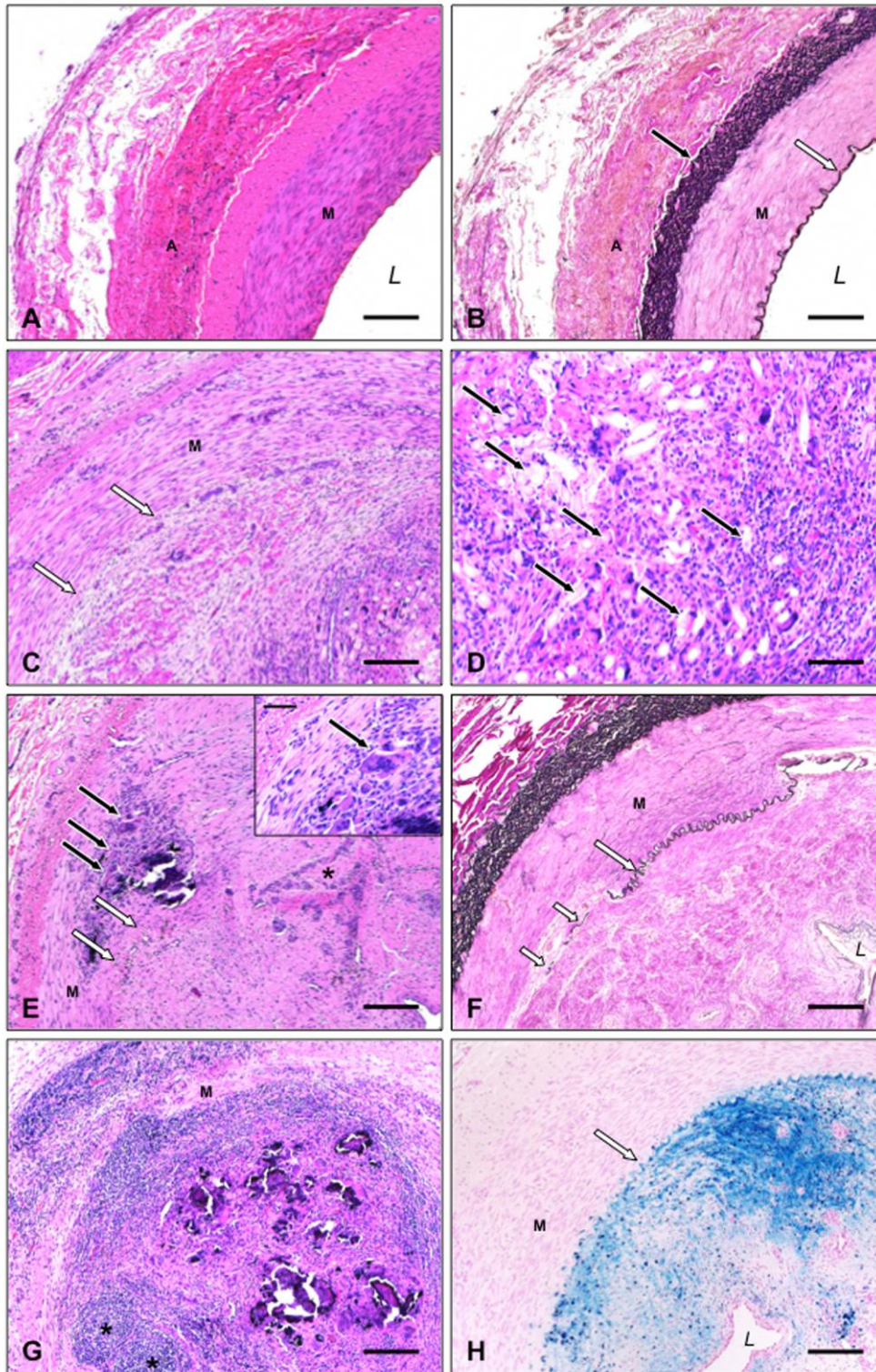


Abbildung 10: Histopathologische Befunde (A, B) Porcine A. femoralis in physiologischem Zustand; A: Adventitia (Tunica externa), M: Media (Tunica media), L: Gefäßlumen, schwarzer Pfeil: Membrana elastica externa, weißer Pfeil: Lamina elastica interna (A: H&E, B: Van Gieson Färbung; Maßstabsbalken = 180 µm). **(C)** A. femoralis 4 Wochen nach Applikation des Angio-Seal VCD mit Obliteration des Gefäßlumens (Tier 6); M: Media, weiße Pfeile: Lamina elastica interna (H&E; Maßstabsbalken = 180 µm). **(D)** Ansammlung von mehrkernigen Histiozyten, Lymphozyten und vereinzelt eosinophilen

Granulozyten um ein polymeres Material (schwarze Pfeile) herum (Tier 6) (H&E; Maßstabsbalken = 90 µm). **(E)** Fortgeschrittene Bildung von Bindegewebe im ehemaligen intravasalen Bereich 12 Wochen nach Applikation eines Angio-Seal VCD (Tier 7). Fokale Kalzifikationen in der Media umgeben von Lymphozyten und mehrkernigen Histiozyten (schwarze Pfeile). Bereiche mit deutlicher Neovaskularisation (Sternchen). Die weißen Pfeile zeigen die Lamina elastica interna (H&E; Maßstabsbalken = 180 µm). Vergrößerter Bildausschnitt: Mehrkernige Riesenzelle (schwarzer Pfeil) in der partiell zerstörten Media (H&E; Maßstabsbalken = 65 µm). **(F)** Subtotale Obliteration der A. femoralis sowie segmentale Destruktion der Lamina elastica interna (weißer Pfeil) mit Residuen von elastischem Material (kurze weiße Pfeile) (Tier 7); (Van Gieson Färbung; Maßstabsbalken = 180 µm). **(G)** Starke inflammatorische Reaktion mit follikulärer Ansammlung kleiner Lymphozyten (Sternchen) und Kalzifikationen innerhalb eines lympho-histiozytären Infiltrats (Tier 7) (H&E; Maßstabsbalken 180 µm). **(H)** Umfangreiche Hemosiderinablagerungen (blau gefärbte Fläche) im Bereich des ehemaligen Gefäßlumens (Tier 7); L: ehemaliges Lumen der A. femoralis (Berliner Blau Färbung, Maßstabsbalken = 180 µm).

Bei der Arterie 12 Wochen nach Implantation des Angio-Seal VCD (Tier 7) ist das Fremdkörpermateriale fast vollständig resorbiert. Es sind unregelmäßige Ansammlungen von Histiozyten und mehrkernigen Riesenzellen assoziiert mit einer dystrophen Verkalkung sichtbar (Abbildung 10 E). Es zeigen sich eine Neovaskularisation und großflächige Hämosiderinablagerungen im Bereich des neu gebildeten kollagenen Gewebes (Abbildung 10 H). Die transmurale zelluläre Infiltration großer Abschnitte der Gefäßwand, die z. T. bis in die Adventitia reicht, verdeutlicht die ausgeprägte Entzündungsreaktion in dieser Arterie. Das zelluläre Infiltrat besteht vorwiegend aus kleinen reaktiven, mitunter in Follikeln angeordneten Lymphozyten, Histiozyten und vereinzelt Granulozyten.

In keinem der Fälle fanden sich Hinweise auf eine Dissektion der Arterie oder die Bildung einer AV-Fistel.

4.2. Ergebnisse des molekularen Ultraschalls unter Verwendung spezieller Microbubbles zum Monitoring des Heilungsprozesses einer Endothelverletzung im Minipig

4.2.1. In vitro Komplement-Aktivierung

Alle getesteten MB-Typen bewirkten keine signifikante Komplement-Aktivierung. Die jeweiligen Messwerte waren mit denen der Negativkontrolle (Veronalpuffer) vergleichbar.

4.2.2. Spezifische Bindung von Microbubbles an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Die MB mit der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Aminosäuresequenz (cycloRGDfK) zeigten eine signifikant höhere Bindung ($12,4 \pm 2,6$ MB/Zelle) an die humanen Endothelzellen als diejenigen MB mit Integrin-unspezifischer Aminosäuresequenz (cycloDRfGK; $5,1 \pm 1,4$ MB/Zelle) und die unbeschichteten MB ($2,2 \pm 0,6$ MB/Zelle).

4.2.3. Analyse der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in porcinen Arterien mit molekularem Ultraschall

Nach 1 Woche und 5 Wochen konnte eine signifikant stärkere Bindung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen MB (cycloRGDfK) im Vergleich zu den nicht-spezifischen MB (cycloDRfGK) sowie zu den unbeschichteten MB an der geschädigten Lokalisation der A. carotis communis festgestellt werden. Auch der Vergleich zwischen der geschädigten linken und der gesunden rechten A. carotis communis zeigte eine deutlich stärkere Bindung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen MB (cycloRGDfK) im Bereich der Endothelverletzung zu diesen Zeitpunkten. Ab 3 Monaten nach der Endothelverletzung konnten keine Unterschiede mehr zwischen der Bindung der einzelnen MB-Typen sowie zwischen gesunder und geschädigter Seite festgestellt werden.

4.2.4. Immunhistologische Analyse

Die immunhistologische Untersuchung lieferte mit den Ergebnissen aus der Bildgebung mittels molekularem Ultraschall übereinstimmende Resultate. Eine Woche nach der Endothelverletzung konnte eine deutlich höhere Anzahl an β_3 -Integrin-positiv gefärbten Arealen evaluiert werden. Nach 3 Monaten konnten auch mit dieser Methode keine Unterschiede mehr zwischen der gesunden und der geschädigten Arterie nachgewiesen werden.

5. Übergreifende Diskussion

Auch wenn in der Gesellschaft eine zunehmend kritische Haltung gegenüber Tierversuchen besteht, bleibt ihre Notwendigkeit für bestimmte Fragestellungen weiterhin bestehen. Die Komplexität eines lebenden Organismus, ganz gleich ob menschlich oder tierisch, lässt sich trotz der zahlreichen in den letzten Jahren entwickelten Alternativmethoden (z. B. Zellkultur, Computersimulationen, Flussmodelle, usw.) nur schwer in vollem Umfang simulieren [15]. Versuchstiere werden daher insbesondere in der Grundlagenforschung, zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden und zur Testung von medizinischen Produkten eingesetzt.

Das 3R-Prinzip nach William Russel und Rex Burch (1959) beschreibt als oberstes Ziel die Vermeidung des Einsatzes von Tieren zu Forschungszwecken (Replacement). Ist dies nicht möglich, so sollte die Anzahl (Reduction) und das Leiden (Refinement) der Versuchstiere auf ein unerlässliches Maß verringert werden [15]. Das 3R-Prinzip ist heute essentieller Bestandteil der wissenschaftlichen Forschung. Seine Umsetzung wird sowohl durch europäisches Recht (Artikel 4 RL 2010/63/EU) [95] als auch durch die nationale Gesetzgebung (§ 7 TierSchG) [1] sichergestellt.

Endovaskuläre Studien unter Verwendung des Schweins als Tiermodell finden u. a. im Kontext der neuroradiologischen, radiologischen und kardiologischen Forschung statt [16, 96-98]. Es bestehen verschiedene anatomische und physiologische Ähnlichkeiten zum Menschen, welche die Eignung des Schweins als Tiermodell bedingen [7, 8, 14, 99]. Ähnlichkeiten bestehen beispielsweise bezüglich der Diameter porciner und humaner Blutgefäße [7, 13], des Koagulations- und Fibrinolysesystems [11, 12, 100] sowie in der Thrombozytenadhäsion an Kunststoffoberflächen [99]. Für endovaskuläre Versuche sind vor allem die vergleichbare Gefäßanatomie bzw. -morphologie sowie die konstant bleibenden Diameter des Schweins von entscheidender Bedeutung [19, 101]. Diese erlauben den Einsatz der auch beim Menschen verwendeten Materialien und Techniken und sind somit wichtig im Bezug auf die Übertragbarkeit der im Versuch gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen.

Die transkutane Punktion einer Arterie, zumeist der A. femoralis, ist eine der Grundlagen transarterieller endovaskulärer Eingriffe. Bei der Punktion in Seldinger

Technik wird in mehreren Schritten eine Katheterschleuse in die Arterie eingeführt, über die alle notwendigen Materialien (z.B. Katheter) in das Gefäßsystem eingebracht werden können (Abbildung 1).

Nach jedem endovaskulären Eingriff besteht die Notwendigkeit des sicheren Verschlusses der Punktionsstelle. Mögliche Komplikationen bei inadäquatem Verschluss sind unter anderem Hämatome, Pseudoaneurysmen und Nachblutungen unterschiedlichen Grades [30, 55]. Dies kann zu einem länger dauernden stationären Aufenthalt des Patienten führen, und in einigen Fällen einen gefäßchirurgischen Eingriff oder bei entsprechend starken Blutungen, eine Bluttransfusion erforderlich machen [30, 35, 36, 46]. Komplikationen treten gehäuft bei Patienten unter Antikoagulanzen oder Plättchenhemmung auf, ebenso bei Verwendung großer Katheterschleusen [29, 30, 46].

Beim Menschen gilt die manuelle Kompression der Punktionsstelle mit anschließender Anlage eines Druckverbands und mehrstündiger Immobilisation als Goldstandard [29, 39, 46]. Seit den 1990er Jahren wurden für die Humanmedizin Gefäßverschlussysteme unterschiedlicher Funktionsweisen entwickelt [28, 33, 38, 39, 55, 102]. Das Ziel eines aktiven VCD ist die Blutungszeit zu reduzieren und somit den Patientenkomfort durch eine schnelle Entfernung der Katheterschleuse und kurze Immobilisationszeiten zu erhöhen, sowie Personalressourcen und Kosten zu sparen [31, 35, 38, 103, 104].

Auch der Einsatz eines VCD kann mit Komplikationen verbunden sein. In der Literatur werden nach Anwendung des Angio-Seal VCD Blutungen (0,3-9%), Infektionen (0,3%), Hämatome (0,2-2,4%), Pseudoaneurysmen (0,4-0,6%), AV-Fisteln (0,5-4%), Gefäßokklusionen (0,2-0,7%) und Ischämien im Bereich der Extremitäten (0,1-4,2%) als mögliche Komplikationen beschrieben [29, 33, 38, 51, 54, 105-107]. Die Komplikationsrate bei Verwendung des Angio-Seal VCD liegt insgesamt bei 0,4-4,2% [42, 52, 54, 104, 105, 108]. Die Hersteller einiger VCDs warnen unter bestimmten Bedingungen vor deren Anwendung [33]. Hierzu zählen Blutgerinnungsstörungen, Schwangerschaft, Gefäßdiameter ≤ 4 bzw. ≤ 5 mm und Allergien gegen Bestandteile des VCDs [48, 109]. Andere Autoren bewerten das Vorliegen einer Arteriosklerose als Risikofaktor für den Einsatz eines VCDs [54].

Vergleicht man die Komplikationsraten beider Methoden, manuelle Kompression der Punktionsstelle und Anwendung eines VCD, so findet man in der Literatur keinen

Konsens. Viele Studien kommen zu dem Ergebnis, dass es keine Unterschiede in der Häufigkeit von Komplikationen zwischen beiden Methoden gibt [34, 110-112]. Einige Autoren berichten von geringeren Komplikationsraten durch den Einsatz eines VCDs [35, 113], während andere wiederum ein erhöhtes Auftreten bestimmter Formen von Komplikationen wie Hämatome (VCD 9,3%; manuelle Kompression 5,1%), Hämatokritabfall > 15% (VCD 5,2%; manuelle Kompression 2,5%) oder die Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs an der Punktionsstelle (VCD: 2,5%; manuelle Kompression 1,3%) festgestellt haben wollen [36, 105]. Die in der Literatur angegebenen Komplikationsraten sind auch abhängig von der jeweiligen Funktionsweise des VCD [34, 105]. Nichtsdestotrotz hat sich der Einsatz eines VCD nach arterieller Gefäßpunktion mittlerweile in der Humanmedizin insbesondere bei einer Störung der Hämostase sowie bei großlumigen Gefäßzugängen etabliert.

Da das Schwein häufig als Versuchstier für endovaskuläre Studien eingesetzt wird [16, 97, 114], stellt sich auch hier die Frage nach einer sicheren Verschlussmöglichkeit der Punktionsstelle, insbesondere im Hinblick auf die in diesen Studien häufig praktizierte doppelte Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel und dem damit verbundenen erhöhten Blutungsrisiko.

Beim Schwein sind die Mm. adductores der Hintergliedmaße zu einem kräftigen Muskel verwachsen [27]. Wie Abbildung 11 verdeutlicht, verläuft zwischen diesen Muskeln im Canalis femoralis die A. femoralis (Abbildung 11) [27]. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse ist diese Arterie nur bei jungen Schweinen zuverlässig palpatorisch zugänglich [57]. Eine manuelle Kompression der Punktionsstelle analog zum Menschen gestaltet sich schwierig und kann keinen vollständigen Gefäßverschluss ohne das Risiko hämorrhagischer Komplikationen gewährleisten [59]. Auch das Anlegen eines Druckverbandes ebenso eine mehrstündige Immobilisation des Tieres, sind nur schwer realisierbar.

Im Rahmen dieser Dissertation wird deshalb ein vaskuläres Gefäßverschlussystem (Angio-Seal vascular closure device, St. Jude Medical, St. Paul, USA) auf seine Eignung für die Spezies Schwein untersucht. Ziel ist es, eine Möglichkeit für einen schnellen, sicheren und effizienten Gefäßverschluss nach vorheriger transkutaner arterieller Punktion beim Minipig unter dualer Plättchenhemmung zu finden.

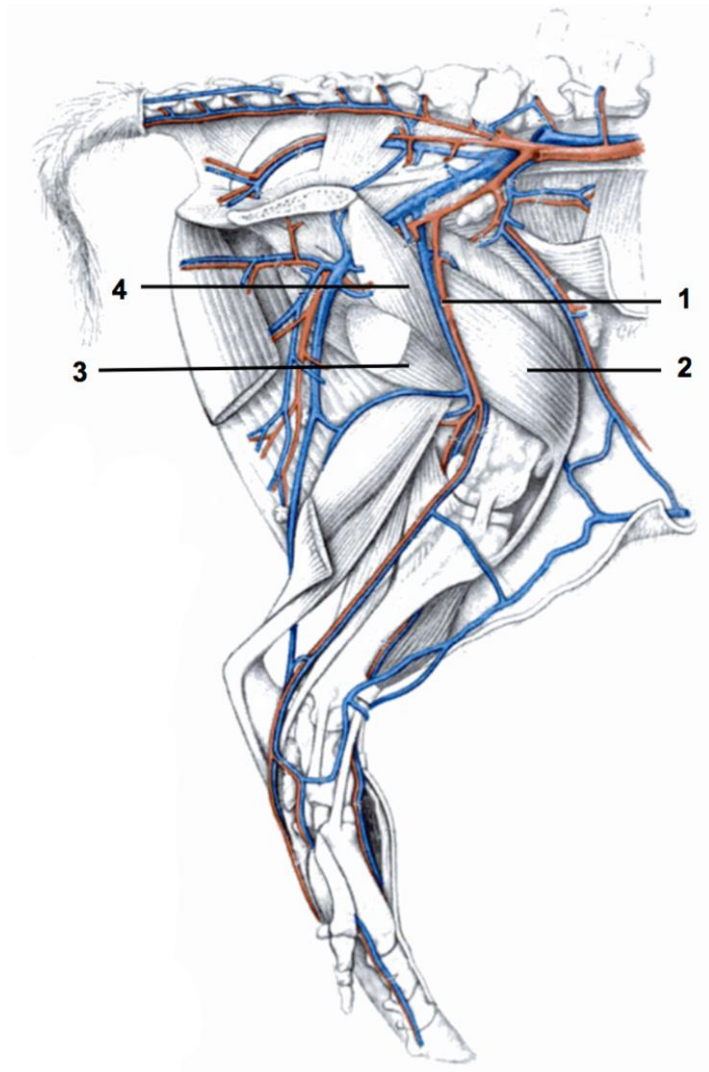


Abbildung 11: Die modifizierte Abbildung nach Nickel et al. [26] zeigt den Verlauf der A. femoralis (1) und der angrenzenden Muskeln M. vastus medialis (2), M. adductor (3) und M. pectineus (4) beim Schwein.

Endovaskuläre Eingriffe werden in der Tiermedizin vergleichsweise selten durchgeführt. Aneurysmen, Gefäßstenosen, Thrombosen und Schlaganfälle, typische Indikationen für endovaskuläre Eingriffe beim Menschen, sind bei Tieren selten. In der Literatur finden sich lediglich Einzelfallberichte [115-124]. Neuroradiologische Interventionen sind in der Tiermedizin bislang nicht etabliert. Bei einigen Tierspezies wie z.B. dem Schwein, existieren sog. Wundernetze (Rete mirabile epidurale) [27]. Diese an der Gehirnbasis gelegenen Arteriennetze verhindern einen direkten Zugang zu den Gefäßen des Circulus arteriosus cerebri wie er beim Menschen möglich ist. Werden endovaskuläre Eingriffe durchgeführt, handelt es sich dabei vorwiegend um kardiologische Eingriffe bei Hunden [125-128]. Die Blutgefäße der Gliedmaßen des Hundes sind im Vergleich zum Schwein

wesentlich besser zugänglich. Nach erfolgter Intervention kann deshalb eine manuelle Kompression der Punktionsstelle erfolgen [125, 126]. Dementsprechend sind wenige Erfahrungen mit VCDs im Bereich der Veterinärmedizin vorhanden.

In Studien werden bereits erste Untersuchungen zur Anwendung von VCDs im Schwein gemacht. In einer Studie von Isfort et al. [59] wird ein Clip-basiertes VCD (Star-Close, Abbott Vascular, Redwood City, USA) auf seine Anwendbarkeit getestet. Hofmann et al. [61] untersuchen die Anwendung zwei verschiedener VCDs (Sutura SuperStitch; Sutura, Fountain Vally, USA und Perclose; Abott Vascular, Santa Clara, USA), deren Funktion auf einem Naht-System basiert. In beiden Studien werden normale Hausschweine verwendet. Auch Tellez et al. [60] verwenden in ihrer Studie mit Yorkshire Schweinen eine klassische Hausschweinrasse. Zurzeit existieren keine Studien zur Anwendbarkeit eines VCDs in Minipigs, obwohl diese aufgrund ihrer geringeren Körpergröße, ihrer höheren Stressresistenz und vor allem ihrer konstanten Gefäßdiameter im Vergleich zum Hausschwein für longitudinale experimentelle Fragestellungen zu bevorzugen sind [7, 19, 101]. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf den Einsatz eines VCDs im Minipig gelegt. Bei den Tieren handelte es sich um Schweine der Rasse Göttingen Minipig, bezogen von der Firma Ellegard Göttingen Minipigs A/S (Dalmoose, Dänemark).

Die wenigen bisherigen Studien zum Einsatz von VCDs bei Hausschweinen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich deren Eignung. Isfort et al. [59] berichten, dass die Applikation des Clip-basierenden VCDs Star-Close bei allen Tieren gelingt. Bei der Abschlusskontrolle nach 28 Tagen werden keine Beeinträchtigungen der Perfusion der A. femoralis festgestellt. Post mortem zeigen sich keine größeren Blutungen im Bereich der Punktionsstelle. In der Arbeit von Hofmann et al. [61] wird von einer fokalen Kontrastmittelaussparung im Bereich der A. femoralis in der angiographischen Kontrolle nach der Applikation der beiden Naht-basierten VCDs Sutura SuperStitch und Perclose berichtet. Ebenso wird von einer Dissektion nach Anwendung des Sutura SuperStitch berichtet. Bei der Kontrolle nach 4 Wochen zeigten alle Gefäße eine regelhafte Kontrastmittelfüllung ohne Aussparungen bei Erhalt des ursprünglichen Diameter. Die histologische Untersuchung ergibt allerdings eine chronische, pathologische Fremdkörperreaktion mit Ausbildung einer Fibrose in der Adventitia und im perivaskulären Gewebe, insbesondere im Bereich des Fadens.

Tellez et al. [60], die die Absorption der intravaskulären Komponente des Angio-Seals im Yorkshire Schwein mittels intravaskulärem Ultraschall untersuchen, können keine Beeinträchtigungen des Blutflusses oder die Ausbildung von Stenosen feststellen. Es ist zu beachten, dass in keiner der drei genannten Arbeiten eine duale thrombozytenhemmende Medikation stattfindet. Studien über die Eignung von VCDs beim Schwein unter Thrombozyten hemmender Therapie fehlen bislang in der Literatur.

Die Ergebnisse der von uns publizierten Studie zeigen, dass durch den Einsatz des Angio-Seal VCD ein sicherer Verschluss einer Punktionsstelle an der A. femoralis im Minipig unter dualer Plättchenhemmung möglich ist und hämorrhagische postinterventionelle Komplikationen verhindert werden können. Somit wird ein möglichst hohes Maß an Tierwohl im Sinne des 3R-Prinzips sichergestellt und das Risiko, dass ein Tier aufgrund von Blutungskomplikationen vorzeitig aus dem Versuch ausscheiden muss, reduziert. Es besteht ferner die Möglichkeit ein Tier mehrfach zu punktieren und somit im Langzeitversuch einzusetzen. Die Anzahl der für einen Versuch benötigten Tiere kann auf diese Weise reduziert werden.

Nach Hoffer et al. [29] würde ein ideales VCD folgende Anforderungen erfüllen:

- Induktion einer vollständigen Hämostase, unabhängig von einer eventuell durchgeführten antikoagulatorischen oder thrombozytenhemmenden Therapie
- sichere Handhabung
- bestenfalls kein Risiko für Komplikationen, mindestens jedoch eine gleiche oder niedrigere Komplikationsrate als bei der manuellen Kompression
- keine Beeinträchtigung oder Einengung des Gefäßlumens
- keine Vergrößerung der Punktionsstelle durch den Einsatz des VCDs
- kein Risiko einer intraarteriellen Embolisation durch die Art der Verschluss technik des VCDs
- im Hinblick auf weitere Punktionen darf das VCD höchstens minimale perivaskuläre Folgen haben und muss die Möglichkeit einer erneuten Punktion gewährleisten

Keines der zurzeit verfügbaren VCDs erfüllt alle der genannten Anforderungen [29].

Auch bei der vorliegenden Arbeit können nicht alle Aspekte gewährleistet werden. So ist zwar eine sichere Anwendung des Angio-Seal VCD im Minipig unter dualer Plättchenhemmung möglich und hämorrhagische Komplikationen können bei allen Tieren (n = 8) bzw. Punktionsstellen (n = 13) vermieden werden, es treten jedoch Gefäßokklusionen (n = 3) und Stenosen (n = 1) auf. Die histopathologische Untersuchung zweier okkludierter Femoralarterien zeigt eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion mit Bildung von Granulationsgewebe und Obliteration des Gefäßlumens. Andere Studien berichten über ähnliche Reaktionen nach Implantation von Polylactid und Polyglycolsäure bei Schweinen [129, 130]. Auch beim Menschen sind Fremdkörperreaktionen nach Anwendung des Angio-Seal VCD beschrieben. Choi und Mitarbeiter [131] berichten von Patienten mit unvollständigem Abbau des sog. Ankers, der intravasalen Komponente des Angio-Seal VCD und einer damit zusammenhängenden Fremdkörperreaktion mit Ausbildung einer Fibrose und Obstruktion des Gefäßlumens. Laut Herstellerangaben ist die Fremdkörperreaktion eine mögliche unerwünschte Folge, die im Zusammenhang mit den Komponenten des Angio-Seal VCD (Kollagen, Faden und Polymer) auftreten kann [48]. Es wird nicht ausgeschlossen, dass es auch beim Schwein zu einer vergleichbaren Reaktion kommen kann.

Neben den bildgebenden Verfahren Computertomographie-Angiographie und der digitalen Subtraktionsangiographie, mit deren Hilfe die Anwendung des Angio-Seal VCD im Minipig untersucht wurde, sind auch weitere bildgebende Methoden, wie der molekulare Ultraschall, zur Diagnostik bei vaskulären Fragestellung im Schwein als Tiermodell geeignet. Dementsprechend wird in der zweiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation eingereichten Arbeit die Methode des molekularen Ultraschalls unter Verwendung spezieller Poly-n-butylcyanoacrylat-Microbubbles, welche zielgerichtet an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden, auf ihre Eignung zum Monitoring des Heilungsprozesses einer Endothelverletzung im Minipig untersucht.

Im Bereich der interventionellen Neuroradiologie werden häufig endovaskuläre Eingriffe mit Hilfe von Ballonkathetern und Stents durchgeführt. Eine mögliche Indikation ist die Behandlung einer Stenose mit dem Ziel der Rekonstruktion des erkrankten Gefäßes, um somit eine adäquate Perfusion des Gehirns zu gewährleisten bzw. wiederherzustellen [132, 133]. Bei solchen Eingriffen kommt es zu einer mechanischen Schädigung des Endothels der Gefäßwand. Die

unmittelbaren Folgen einer derartigen Endothelverletzung sind Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung, gefolgt von einer Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine. Dies führt zu einer Aktivierung, Proliferation und Migration von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) in die Intima und somit zu einer Verdickung der Intima mit der Gefahr einer Re- oder In-Stent-Stenose [134, 135]. Aufgrund dieses potentiellen Risikos wäre eine Methode zur Überwachung des Heilungsprozesses des Endothels wünschenswert und hilfreich, um im Fall einer pathologischen, hyperplastischen Endothelregeneration rechtzeitig eine entsprechende antiproliferative Therapie einzuleiten und so eine Re- oder In-Stent-Stenose zu verhindern.

Der molekulare Ultraschall ist eine Bildgebungsmethode, bei der mit Hilfe von venös injizierten mit Gas gefüllten Kontrastmittelbläschen (MB) zielgerichtet Targetmoleküle im vaskulären Kompartiment sichtbar gemacht werden können [88, 89, 91, 93]. Um ein spezifisches Zielgewebe bzw. Targetmoleküle darstellen zu können, werden die MB mit speziellen Liganden gekoppelt. Es stehen MB zur Visualisierung verschiedener Zelltypen zu Verfügung [93]. Ein möglicher Ligand ist $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.

Integrine sind Glykoproteine, welche heterodimere Transmembranrezeptoren für verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix bilden. Sie bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit, anhand derer die Integrine voneinander zu unterscheiden sind [136]. Integrine nehmen über verschiedene Signaltransduktionswege (z.B. über Aktin-assoziierte Proteine und Kinasen) großen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Lebensdauer von Zellen [136, 137]. In der von uns durchgeführten Arbeit wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Ligand gewählt. Dieses Integrin wird von gesunden, nicht aktivierten Endothelzellen und VSMCs nur in geringem Maße exprimiert [138]. Im Zuge einer Endothelverletzung, z.B. durch eine Ballonangioplastie oder das Applizieren eines Stents, werden diese Zelltypen aktiviert und exprimieren in Folge dessen verstärkt $\alpha_v\beta_3$ -Integrin [134, 137, 138]. Dieses bindet verschiedene Matrix- und Adhäsionsmoleküle wie Fibronektin, Fibrinogen, Thrombin, von-Willebrand-Faktor oder Vitronectin über eine spezielle Bindungsdomäne, welche sich aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGD-Sequenz) zusammensetzt [136, 139]. Fibronektin

beispielsweise wirkt proliferativ auf verschiedene vaskuläre Zellen im Rahmen der Wundheilung [137, 139].

Neben den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen MB (cycloRGDfK) werden in der vorliegenden Arbeit als Negativkontrollen zusätzlich unbeschichtete MB sowie MB mit einer für das ausgewählte Integrin unspezifischen Sequenz (cycloDRfGK) eingesetzt. Die entsprechenden Peptidsequenzen werden kovalent über aktivierte Carboxylgruppen an der Oberfläche der MB gebunden.

Bereits in anderen Tiermodellen (z.B. Kaninchen, Ratte) konnte eine verstärkte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin durch aktivierte Endothelzellen und VSMCs nachgewiesen werden [138, 140, 141]. Das Schwein mit seinen im Vergleich zu anderen Tierspezies großen, dem Menschen ähnlichen Gefäßdiametern bietet als Tiermodell den Vorteil, dass die in der Humanmedizin standardmäßig eingesetzten Materialien (z.B. Ballonkatheter, Stents) angewendet werden können [13]. Das Minipig als spezielle Rasse eignet sich aufgrund seiner relativ stabilen Gefäßgröße besonders gut für longitudinale Studien [19]. Diese zweite Arbeit zeigt somit, dass das Schwein auch im Bereich neuer, molekularer Bildgebungsverfahren ein gut geeignetes Tiermodell ist.

6. Zusammenfassung

Die Spezies Schwein wird für verschiedene Forschungsgebiete der Humanmedizin als Tiermodell eingesetzt. Als Schwerpunkte sind Herz-Kreislaufferkrankungen, Diabetesforschung, Transplantations- und Notfallchirurgie sowie Osteosynthese- und Osteoporoseforschung zu nennen [15]. In der Neuroradiologie wird das Schwein als Versuchstier vorwiegend für die Entwicklung und Erprobung neuer interventioneller Behandlungsmethoden und -techniken genutzt [13, 16]. Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war die Testung des vaskulären Verschlusssystems Angio-Seal (St. Jude Medical, St. Paul, USA) auf seine Eignung im Minipig. Es zählt zu den sog. aktiven VCDs und ist eines der am häufigsten verwendeten Systeme [38, 40]. Der Verschluss der Punktionsstelle beruht hierbei auf einer Kompression der Gefäßwand kombiniert mit einer durch Kollagen herbeigeführten Hämostaseinduktion [45, 46].

Für diese Arbeit wurde bei 8 Minipigs zum Verschluss der Punktionsstelle ($n = 13$) an der A. femoralis das Angio-Seal VCD in den Größen 6 F und 8 F eingesetzt. Die Tiere wurden in unterschiedlichen Intervallen mit bildgebenden Verfahren (CTA und Katheterangiographie) untersucht. Sowohl die mit einem Angio-Seal VCD behandelten Femoralarterien als auch die unbehandelten kontralateralen Aa. femorales von 2 Minipigs wurden nach Versuchsende histopathologisch untersucht. Die Applikation des Angio-Seal VCD gelang in allen Fällen ohne Komplikationen. Keines der Tiere zeigte postinterventionelle hämorrhagische Komplikationen. Allerdings traten bei insgesamt 3 Punktionsstellen Gefäßokklusionen auf. Bei einem Tier wurde die Gefäßokklusion 4 Wochen nach Implantation des VCD, bei den anderen beiden jeweils nach einer Woche diagnostiziert. Ein weiteres Tier zeigte nach 8 Wochen eine 50 %ige Stenose einer mit VCD behandelten A. femoralis. Diese Befunde konnten sowohl mithilfe der CTA als auch angiographisch nachgewiesen werden. Die histopathologische Untersuchung zweier nach Einsatz des VCD okkludierten Arterien demonstriert eine entzündliche Fremdkörperreaktion. Die unbehandelten, kontralateralen Arterien wurden jeweils als Kontrolle mituntersucht und wiesen keine pathologischen Veränderungen auf. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass das Angio-Seal VCD bei einem Einsatz im Minipig nach arterieller Punktion der A. femoralis zuverlässig vor hämorrhagischen Komplikationen schützt. Allerdings war der Einsatz des Angio-Seal VCD mit einer erhöhten Rate an Gefäßokklusionen und Stenosen verbunden. Es besteht weiterer

Forschungsbedarf, um die genauen Ursachen für das Auftreten dieser unerwünschten Reaktionen zu eruieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dazu beitragen, den Einsatz des Minipigs als Versuchstier für endovaskuläre Studien zu erleichtern. Durch die Möglichkeit eines sicheren Verschlusses einer Punktionsstelle ohne die Gefahr postinterventioneller hämorrhagischer Komplikationen ist eine Nutzung des Minipigs in longitudinalen Studien möglich.

Die zweite Arbeit dieser Dissertation befasst sich mit dem Monitoring vaskulärer Heilungsprozesse nach einer Endothelverletzung im Minipig als Tiermodell. Es wurde die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin durch aktivierte Endothelzellen und VSMCs mit Hilfe des molekularen Ultraschalls untersucht. Als Ultraschall-Kontrastmittel wurden $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MB, als Negativkontrollen Integrin-unspezifische sowie unbeschichtete MB eingesetzt. Als zusätzliche Untersuchungsmethode zur Bekräftigung der Ergebnisse des molekularen Ultraschalls wurden immunhistologische Analysen durchgeführt. Es konnte eine signifikant stärkere $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression innerhalb der ersten 5 Wochen nach der vorsätzlich durch Ballondilatation herbeigeführten Endothelverletzung an der A. carotis communis mithilfe der spezifischen MB festgestellt werden. Nach 3 Monaten konnten keine Unterschiede mehr zwischen der Bindungsaffinität der einzelnen MB-Typen sowie zwischen der geschädigten und der gesunden A. carotis communis ermittelt werden. Die Spezies Schwein wurde in dieser Studie erfolgreich als Tiermodell zur Evaluierung einer neuartigen, molekularen Bildgebungsmethode eingesetzt, die in Zukunft beim Menschen zur Kontrolle vaskulärer Heilungsprozesse eingesetzt werden soll, um Re- und In-Stent-Stenosen frühzeitig verhindern zu können.

7. Summary

Pigs are a species frequently used in various fields of human medical research. They are predominantly being used for research of cardiovascular diseases, diabetes mellitus, graft and emergency surgery as well as for osteosynthesis and osteoporosis. In neurointerventional research the pig is being used as an animal model for development and testing of novel devices and treatment modalities. The aim of this thesis was to test the Angio-Seal VCD (St. Jude Medical, St. Paul, USA) in minipigs. The Angio-Seal VCD is an active system which is widely used in human medicine [38, 40]. It works by compression of the puncture site in combination with collagen-induced hemostasis [45, 46].

In this study, 13 femoral arteries of 8 minipigs were punctured and afterwards closed using the Angio-Seal VCD in sizes of 6 F and 8 F. The sealed puncture sites were analysed angiographically or by CTA at various intervals. The technical success rate of the Angio-Seal VCD was 100 %. No postinterventional hemorrhagic complications occurred. However, after application of the Angio-Seal VCD, three arteries were found to be occluded later on. In one case occlusion was detected 4 weeks and in another case 1 week after VCD application. Another animal developed a 50 % stenosis that was detected in one artery 8 weeks after application of the Angio-Seal VCD. The findings were proven by CTA as well as angiographically. In 2 (of these?) cases, the punctured artery closed with a VCD and the untreated contra-lateral femoral artery were examined histologically. Histopathological analysis of the sealed and occluded arterial segments showed a foreign body reaction. The untreated arteries were in physiological condition.

In conclusion, the Angio-Seal VCD effectively prevents relevant bleeding complications after femoral arterial puncture in minipigs. However, vessel occlusion and stenosis are possible complications when using the Angio-Seal VCD. Further research may be helpful to elucidate the causes of these undesirable side effects.

In the second study microbubbles (MB) targeted to $\alpha_v\beta_3$ -integrin were evaluated for monitoring of vascular healing after vessel injury in pigs using molecular ultrasound imaging. In this context the expression of $\alpha_v\beta_3$ -integrin by activated endothelial cells and vascular smooth muscle cells (VSMCs) was analyzed. $\alpha_v\beta_3$ -integrin-specific MB were used as contrast agent. Unspecific and uncoated MB acted as negative control. Furthermore, immunohistological analysis was performed to support the results of the

molecular ultrasound imaging. Within the first 5 weeks after vessel injury based on balloon dilatation of the common carotid artery, significant increased $\alpha_v\beta_3$ -integrin-expression was observed. As from third month after vessel injury no differences regarding to the binding affinity of the different MB-types existed. Besides, no differences between the injured and the healthy artery could be detected as from this moment. In this study the pig was used as an animal model to evaluate a novel, molecular imaging methode, which should be employed in humans to monitor endothelial healing process, prospectively. The intended aim will be to prevent re- and in-stent- stenosis in humans, who undergo endovascular interventions.

8. Publikationen

8.1. Erstautorenschaften

Long term outcome after application of the Angio-Seal vascular closure device in minipigs

Lisa Kabelitz¹, Andrea Nonn¹, Kay W. Nolte², Omid Nikoubashman¹, Ahmed Othman^{1,3}, Sarah Heringer¹, Martin Kramer⁴, Martin Wiesmann¹, Marc A. Brockmann^{1,5}

¹ Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Germany

² Institute of Neuropathology, RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Germany

³ Department of Radiology, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany

⁴ Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

⁵ Department of Neuroradiology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany

PLos One. 2016 September 28; 11(9): e0163878

Long term outcome after application of the Angio-Seal vascular closure device in minipigs

Background: Minipigs are frequently used in (neuro-)interventional research. Longitudinal experiments may require repeated vessel access via the femoral artery. Anticoagulation and incomppliance of the animals necessitates to use a vascular closure device (VCD). The effects of the Angio-Seal VCD in minipigs were longitudinally assessed.

Methods: Minipig (42 ± 8.4 kg body weight) femoral arteries were sealed using the 8 F ($n = 6$) or 6 F ($n = 7$) Angio-Seal VCD. The pre-interventional femoral artery diameter was 5.1 ± 0.4 mm (4.3–5.8 mm). Sealed puncture sites were analysed angiographically as well as by computed tomography angiography (CTA) for a mean period of 14.1 ± 8.0 weeks (1–22 weeks). All animals were constantly treated with acetylsalicylic acid (450 mg/d ($n = 7$) or 100 mg/d ($n = 1$)) and clopidogrel (75 mg/d ($n = 7$)). Non-instrumented ($n = 2$) and arteries sealed using the VCD ($n = 2$) were examined histologically.

Results: No postoperative hemorrhagic complications were observed. Three arteries were occluded after VCD placement (1 animal diagnosed after 4 weeks (8 F), 2 animals after 1 week (6F)) and remained so until the end of the experiments after 22, 12 and 4 weeks, respectively. In one artery a 50 % stenosis 8 weeks after application of a 6 F Angio-Seal was detected. In 69.2 % ($n = 9$) the VCD was applied without complications. Histopathological analysis of the sealed arterial segments showed subtotal obliteration of the vessel lumen, excessive formation of collagenous tissue and partial damage of the internal elastic lamina.

Conclusion: The Angio-Seal VCD prevents relevant hemorrhagic complications in minipigs treated with dual platelet inhibition, but is associated with increased vessel occlusion rates.

8.2. Co-Autorenschaften

Molecular Ultrasound Imaging of $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in Carotid Arteries of Pigs After Vessel Injury

Anne Rix*, Stanley Fokong*, Sarah Heringer †, Rastislav Pjontek †, Lisa Kabelitz †, Benjamin Theek*, Marc-Alexander Brockmann †, Martin Wiesmann †, Fabian Kiessling*

From the *Institute for Experimental Molecular Imaging, University Clinic and Helmholtz Center for Biomedical Engineering, and †Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, RWTH Aachen University, Aachen, Germany.

Investigative Radiology. 2016 April 26; [Epub ahead of print]

Molecular Ultrasound Imaging of $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression in Carotid Arteries of Pigs After Vessel Injury

Objectives: Interventions such as balloon angioplasty can cause vascular injury leading to platelet activation, thrombus formation, and inflammatory response. This induces vascular smooth muscle cell activation and subsequent re-endothelialization with expression of $\alpha_v\beta_3$ -integrin by endothelial cells and vascular smooth muscle cell. Thus, poly-N-butylcyanoacrylate microbubbles (MBs) targeted to $\alpha_v\beta_3$ -integrin were evaluated for monitoring vascular healing after vessel injury in pigs using molecular ultrasound imaging.

Materials and methods: Approval for animal experiments was obtained. The binding specificity of $\alpha_v\beta_3$ -integrin-targeted MB to human umbilical vein endothelial cells was tested with fluorescence microscopy. In vivo imaging was performed using a clinical ultrasound system and an 8-MHz probe. Six mini pigs were examined after vessel injury in the left carotid artery. The right carotid served as control. Uncoated MB, cDRG-coated MB, and $\alpha_v\beta_3$ -integrin-specific cRGD-coated MB were injected sequentially. Bound MBs were assessed 8 minutes after injection using ultrasound replenishment analysis. Measurements were performed 2 hours, 1 and 5 weeks, and 3 and 6 months after injury. In vivo data were validated by immunohistochemistry.

Results: Significantly stronger binding of cRGD-MB than MB and cDRG-MB to human umbilical vein endothelial cells was found ($P < 0.01$). As vessel injury leads to upregulation of $\alpha_v\beta_3$ -integrin, cRGD-MBs bound significantly stronger ($P < 0.05$) in injured carotid arteries than at the counter side 1 week after vessel injury and significant differences could also be observed after 5 weeks. After 3 months, $\alpha_v\beta_3$ -integrin expression decreased to baseline and binding of cRGD-MB was comparable in both vessels. Values remained at baseline also after 6 months.

Conclusions: Ultrasound imaging with RGD-MB is promising for monitoring vascular

healing after vessel injury. This may open new perspectives to assess vascular damage after radiological interventions.

Endovascular salvage of stents

using a “snare-over-stentretriever“ (SOS) technique

Tareq Meyer¹, Omid Nikoubashman^{1,2}, **Lisa Kabelitz¹**, Marguerite Müller¹, Ahmed Othman¹, Saif Afat¹, Martin Kramer³, Martin Wiesmann¹, Marc A. Brockmann¹, Carolin Brockmann¹

¹ Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital RWTH Aachen, Aachen, Germany

² Institute of Neuroscience and Medicine 4, Medical Imaging Physics, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany

³ Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Journal of Vascular and Interventional Radiology; eingereicht

Endovascular salvage of stents

using a “snare-over-stent retriever” (SOS) technique

Background and Purpose: Misplacement, dislocation, loss or incomplete unfolding of stents are potential complications in interventional neuroradiology. Aim of this study was to elaborate a reproducible, safe minimally-invasive technique for the endovascular retrieval of stents.

Materials and Methods: A microsnare was slipped over a microcatheter and the microcatheter-tip was placed a few mm proximally of the „misplaced“ stent that needed to be salvaged. A stent-retriever was partially opened directly proximal to the “misplaced” stent by unsheating and then carefully pushed over the proximal markers of the “misplaced” stent. The „misplaced“ stent was captured by resheathing the stent retriever while applying slight pressure on the stent retriever wire, until it interlocked with the „misplaced“ stent. The interlocked stents were secured by the microsnare, which was advanced over the microcatheter containing the stent retriever. Finally, the “misplaced” stent was extracted by simultaneously pulling back the microcatheters of the microsnare and the stent retriever. This "snare-over-stent retriever" (SOS) technique was repetitively tested with different combinations of stent-retrievers (Trevo and Solitaire) and “misplaced” stents (Enterprise, Aclino, PED, FRED, Neuroform Atlas) in an in vitro system (n=25), as well as in pigs in vivo (n=10).

Results: In-vitro, extraction was successful in 22 out of 24 retrieval maneuvers (92 %). In vivo, we were able to successfully salvage 10 out of 10 stents (100 %). In the animal model no dissections occurred. In one case self-limiting vasospasm was observed.

Conclusions: The snare-over-stent (SOS) technique is a promising method for endovascular retrieval of stents.

Minimally Invasive Monitoring of Chronic Central Venous Catheter Patency in Mice Using Digital Subtraction Angiography (DSA)

Giovanna Figueiredo^{1,2}, Teresa Fiebig², Stefanie Kirschner², Omid Nikoubashman¹,
Lisa Kabelitz¹, Ahmed Othman¹, Andrea Nonn¹, Martin Kramer³, Marc A.
Brockmann^{1,2*}

¹ Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital
of the RWTH Aachen, Aachen, Germany

² Department of Neuroradiology, University Medical Center Mannheim, Medical
Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

³ Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-
University, Giessen, Germany

PLoS One. 2015 June 22; 10(6): e0130661

Minimally invasive monitoring of chronic central venous catheter patency in mice using digital subtraction angiography (DSA)

Background: Repetitive administration of medication or contrast agents is frequently performed in mice. The introduction of vascular access mini-ports (VAMP) for mice allows long-term vascular catheterization, hereby eliminating the need for repeated vessel puncture. With catheter occlusion being the most commonly reported complication of chronic jugular vein catheterization, we tested whether digital subtraction angiography (DSA) can be utilized to evaluate VAMP patency in mice.

Methods: Twenty-three mice underwent catheterization of the jugular vein and subcutaneous implantation of a VAMP. The VAMP was flushed every second day with 50 μ L of heparinized saline solution (25 IU/ml). DSA was performed during injection of 100 μ L of an iodine based contrast agent using an industrial X-ray inspection system intraoperatively, as well as 7 ± 2 and 14 ± 2 days post implantation.

Results: DSA allowed localization of catheter tip position, to rule out dislocation, kinking or occlusion of a microcatheter, and to evaluate parent vessel patency. In addition, we observed different ante- and retrograde collateral flow patterns in case of jugular vein occlusion. More exactly, 30 % of animals showed parent vessel occlusion after 7 ± 2 days in our setting. At this time point, nevertheless, all VAMPs verified intravascular contrast administration. After 14 ± 2 days, intravascular contrast injection was verified in 70 % of the implanted VAMPs, whereas at this point of time 5 animals had died or were sacrificed and in 2 mice parent vessel occlusion hampered intravascular contrast injection. Notably, no occlusion of the catheter itself was observed.

Conclusion: From our observations we conclude DSA to be a fast and valuable minimally invasive tool for investigation of catheter and parent vessel patency and for anatomical studies of collateral blood flow in animals as small as mice.

9. Literaturverzeichnis

1. *Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das durch Artikel 8 Absatz 13 des Gesetzes vom 3. Dezember 2015 (BGBl. I S. 2178) geändert worden ist.*
2. DRZE, *Tierversuche in der Forschung*. November 2015.
3. BMEL, *Versuchstierzahlen 2014*.
4. BMEL, *Tierschutzbericht der Bundesregierung 2015*.
5. BMEL, *Trendwende: Erstmals weniger Tiere für wissenschaftliche Versuche verwendet*. 2014.
6. Destatis, *Schlachtungen und Fleischerzeugung*. Vol. Fachserie 3 Reihe 4.2.1. 2012, Wiesbaden.
7. Conn, P.M., *Sourcebook of models for biomedical research*. 2007: Springer Science & Business Media.
8. Goodman, S.L., *Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials*. J Biomed Mater Res, 1999. **45**(3): p. 240-250.
9. Hannon, J.P., Bossone, C., and Wade, C., *Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research*. Lab Anim Sci, 1990. **40**(3): p. 293-298.
10. Höhle, P., *Zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovaskulärer Studien: Unterschiede der Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme bei häufig verwendeten Tierspezies im Vergleich zum Menschen*. Med. Diss. Aachen, 2000: p. 38-80.
11. Siller-Matula, J.M., Plasenzotti, R., Spiel, A., Quehenberger, P., and Jilma, B., *Interspecies differences in coagulation profile*. Thromb Haemost, 2008. **100**(3): p. 397-404.
12. Münster, A.-M.B., Olsen, A.K., and Bladbjerg, E.-M., *Usefulness of human coagulation and fibrinolysis assays in domestic pigs*. Comp Med, 2002. **52**(1): p. 39-43.
13. Gralla, J., Schroth, G., Remonda, L., Fleischmann, A., Fandino, J., Slotboom, J., and Brekenfeld, C., *A dedicated animal model for mechanical thrombectomy in acute stroke*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(6): p. 1357-1361.
14. Nunoya, T., Shibuya, K., Saitoh, T., Yazawa, H., Nakamura, K., Baba, Y., and Hirai, T., *Use of miniature pig for biomedical research, with reference to toxicologic studies*. J Toxicol Pathol, 2007. **20**(3): p. 125-132.
15. DFG, *Tierversuche in der Forschung*. Lemmens Verlags- & Mediengesellschaft mbH.
16. Nonn, A., Kirschner, S., Figueiredo, G., Kramer, M., Nikoubashman, O., Pjontek, R., Wiesmann, M., and Brockmann, M.A., *Feasibility, Safety, and Efficacy of Flow-Diverting Stent-Assisted Microsphere Embolization of Fusiform and Sidewall Aneurysms*. Neurosurg, 2015.
17. Marinov, G.R., Marois, Y., Paris, E., Rob, P., Formichi, M., Douville, Y., and Guidoin, R., *Can the infusion of elastase in the abdominal aorta of the Yucatan miniature swine consistently produce experimental aneurysms?* Invest Surg, 1997. **10**(3): p. 129-150.
18. Massoud, T.F., Ji, C., Vinuela, F., Turjman, F., Guglielmi, G., Duckwiler, G.R., and Gobin, Y.P., *Laboratory simulations and training in endovascular*

- embolotherapy with a swine arteriovenous malformation model. AJNR Am J Neuroradiol*, 1996. **17**(2): p. 271-279.
19. Hiebl, B., Müller, C., Jung, F., Hünigen, H., Hamm, B., Plendl, J., and Niehues, S., *Macro- and micromorphometric studies of the vascular structures from the Göttingen Minipig. Appl Cardiopulm Pathophysiol*, 2009. **13**(4), 318-321.
 20. Peuster, M., Hesse, C., Schloo, T., Fink, C., Beerbaum, P., and von Schnakenburg, C., *Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. Biomaterials*, 2006. **27**(28): p. 4955-4962.
 21. Tepe, G., Muschick, P., Laule, M., Reddig, F., Claussen, C.D., Dinkelborg, L.M., Tielemans, H., Wehrmann, M., and Duda, S.H., *Prevention of carotid artery restenosis after sirolimus-coated stent implantation in pigs. Stroke*, 2006. **37**(2): p. 492-494.
 22. Vodička, P., Smetana, K., Dvořánková, B., Emerick, T., Xu, Y.Z., Ourednik, J., Ourednik, V., and Motlík, J., *The miniature pig as an animal model in biomedical research. Ann N Y Acad Sc*, 2005. **1049**(1): p. 161-171.
 23. Schulz-Schüpke, S., Helde, S., Gewalt, S., Ibrahim, T., Linhardt, M., Haas, K., Hoppe, K., Böttiger, C., Groha, P., and Bradaric, C., *Comparison of vascular closure devices vs manual compression after femoral artery puncture: the ISAR-CLOSURE randomized clinical trial. Jama*, 2014. **312**(19): p. 1981-1987.
 24. Knapp, S. and Stroszczyński, C., *Arterielle Zugangswege in der interventionellen Radiologie. Radiologe*, 2008. **48**(4): p. 375-379.
 25. Hamm, C.W., Albrecht, A., Bonzel, T., Kelm, M., Lange, H., Schachinger, V., Terres, W., and Voelker, W., *Diagnostische Herzkatheteruntersuchung. Clin Res Cardiol*, 2008. **97**(12): p. 925.
 26. Nickel, R., Schummer A, and Seiferle E, *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane. Vol. 4., unveränderte Auflage. 2005, Stuttgart: Parey Verlag.*
 27. König, H.E., and Liebich, H.-G., *Anatomie der Haussäugetiere, Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Vol. 4., überarbeitete Auflage. 2009, Stuttgart: Schattauer GmbH.*
 28. Jahnke, T., and Müller-Hülsbeck, S., *Vascular closure devices in arterial vascular interventional procedures. Radiologie up2date*, 2013. **13**(01): p. 15-30.
 29. Hoffer, E.K., and Bloch, R.D., *Percutaneous arterial closure devices. J Vasc Interv Radiol*, 2003. **14**(7): p. 865-885.
 30. Das, R., Ahmed, K., Athanasiou, T., Morgan, R.A., and Belli, A.-M., *Arterial closure devices versus manual compression for femoral haemostasis in interventional radiological procedures: a systematic review and meta-analysis. Cardiovasc Interv Radiol*, 2011. **34**(4): p. 723-738.
 31. Silber, S., *10 Jahre arterielle Verschlusssysteme: Eine kritische Analyse ihrer Anwendung nach PTCA. Z Kardiol*, 2000. **89**(5): p. 383-389.
 32. Patel, M.R., Jneid, H., Derdeyn, C.P., Klein, L.W., Levine, G.N., Lookstein, R.A., White, C.J., Yeghiazarians, Y., and Rosenfield, K., *Arteriotomy Closure Devices for Cardiovascular Procedures A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation*, 2010. **122**(18): p. 1882-1893.
 33. Dauerman, H.L., Applegate, R.J., and Cohen, D.J., *Vascular closure devices: the second decade. J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(17): p. 1617-1626.
 34. Nikolsky, E., Mehran, R., Halkin, A., Aymong, E.D., Mintz, G.S., Lasic, Z., Negoita, M., Fahy, M., Krieger, S., and Moussa, I., *Vascular complications associated with arteriotomy closure devices in patients undergoing*

- percutaneous coronary procedures: a meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(6): p. 1200-1209.
35. Arora, N., Matheny, M.E., Sepke, C., and Resnic, F.S., *A propensity analysis of the risk of vascular complications after cardiac catheterization procedures with the use of vascular closure devices*. Am Heart J, 2007. **153**(4): p. 606-611.
 36. Dangas, G., Mehran, R., Kokolis, S., Feldman, D., Satler, L.F., Pichard, A.D., Kent, K.M., Lansky, A.J., Stone, G.W., and Leon, M.B., *Vascular complications after percutaneous coronary interventions following hemostasis with manual compression versus arteriotomy closure devices*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(3): p. 638-641.
 37. Gonze, M.D., Sternbergh, W.C., Salartash, K., and Money, S.R., *Complications associated with percutaneous closure devices*. Am J Surg, 1999. **178**(3): p. 209-211.
 38. Bangalore, S., Arora, N., and Resnic, F.S., *Vascular Closure Device Failure: Frequency and Implications A Propensity-Matched Analysis*. Circ Cardiovasc Interv, 2009. **2**(6): p. 549-556.
 39. Bechara, C.F., Annambhotla, S., and Lin, P.H., *Access site management with vascular closure devices for percutaneous transarterial procedures*. J Vasc Surg, 2010. **52**(6): p. 1682-1696.
 40. Gargiulo, N.J., Veith, F.J., Ohki, T., Scher, L.A., Berdejo, G.L., Lipsitz, E.C., Menegus, M., and Greenberg, M., *Histologic and duplex comparison of the perclose and angio-seal percutaneous closure devices*. Vascular, 2007. **15**(1): p. 24-29.
 41. Steinkamp, H.J., Werk, M., Beck, A., Teichgräber, U., Haufe, M., and Felix, R., *Excimer laser-assisted recanalisation of femoral arterial stenosis or occlusion caused by the use of Angio-Seal*. Euro Radiol, 2001. **11**(8): p. 1364-1370.
 42. Abando, A., Hood, D., Weaver, F., and Katz, S., *The use of the Angioseal device for femoral artery closure*. J Vasc Surg, 2004. **40**(2): p. 287-290.
 43. Applegate, R.J., Rankin, K.M., Little, W.C., Kahl, F.R., and Kutcher, M.A., *Restick following initial Angioseal use*. Catheter Cardiovasc Interv, 2003. **58**(2): p. 181-184.
 44. St. Jude Medical, *Angio-Seal VIP Vascular Closure Device Brochure*. 29.12.2015]; Available from: <http://professional.sjm.com/products/vas/hemostasis-management/vascular-closure-devices/angio-seal-vip>.
 45. Park, Y., Roh, H.G., Choo, S.W., Lee, S.H., Shin, S.W., Do, Y.S., Byun, H.S., Park, K.B., and Jeon, P., *Prospective Comparison of Collagen Plug (Angio-Seal™) and Suture-Mediated (the Closer S™) Closure Devices at Femoral Access Sites*. Korean J Radiol, 2005. **6**(4): p. 248-255.
 46. Eggebrecht, H., Haude, M., Baumgart, D., Oldenburg, O., Herrmann, J., Bruch, C., Hunold, P., Neurohr, C., von Birgelen, C., and Welge, D., *Hämostatischer Verschluss der arteriellen Punktionsstelle mittels Angio-Seal™ nach diagnostischer Herzkatheteruntersuchung oder Koronarintervention*. Herz, 1999. **24**(8): p. 607-613.
 47. St. Jude Medical, *Angio-Seal VIP vascular closure device*. 22.01.2016]; Available from: <http://professional.sjm.com/products/vas/hemostasis-management/vascular-closure-devices/angio-seal-vip>.
 48. St. Jude Medical, *Instruction for use Angio-Seal VIP Vascular Closure Device*. 29.12.2015]; Available from: <https://http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&v>

[ed=0ahUKEwj5neWN3oDKAhUHXBQKHSCEDVYQFggcMAA&url=https%3A%2F%2Fmanuals.sjm.com%2F~%2Fmedia%2Fmanuals%2Fproduct-manual-pdfs%2F8%2Fd%2F8d810476-6b64-4a38-9fd1-db825e378709.ashx&usg=AFQjCNEDrTPUs8h2j_fulx02Ds0eyjCbAA&bvm=bv.110151844,d.d24](https://www.st Jude Medical.com/media/manuals/product-manual-pdfs/2F8%2Fd%2F8d810476-6b64-4a38-9fd1-db825e378709.ashx&usg=AFQjCNEDrTPUs8h2j_fulx02Ds0eyjCbAA&bvm=bv.110151844,d.d24).

49. Martin, J.L., Pratsos, A., Magargee, E., Mayhew, K., Pensyl, C., Nunn, M., Day, F., and Shapiro, T., *A randomized trial comparing compression, perclose proglide™ and Angio- Seal VIP™ for arterial closure following percutaneous coronary intervention: The cap trial*. Catheter Cardiovasc Interv, 2008. **71**(1): p. 1-5.
50. Kussmaul, W.G., Buchbinder, M., Whitlow, P.L., Aker, U.T., Heuser, R.R., King, S.B., Kent, K.M., Leon, M.B., Kolansky, D.M., and Sandza, J.G., *Rapid arterial hemostasis and decreased access site complications after cardiac catheterization and angioplasty: results of a randomized trial of a novel hemostatic device*. J Am Coll Cardiol, 1995. **25**(7): p. 1685-1692.
51. Michalis, L.K., Rees, M.R., Patsouras, D., Katsouras, C.S., Goudevenos, J., Pappas, S., Sourla, E., Kolettis, T., Sioros, L., and Zotou, P., *A prospective randomized trial comparing the safety and efficacy of three commercially available closure devices (Angioseal, Vasoseal and Duett)*. Cardiovasc Interv Radiol, 2002. **25**(5): p. 423-429.
52. Ratnam, L.A., Raja, J., Munneke, G.J., Morgan, R.A., and Belli, A.-M., *Prospective nonrandomized trial of manual compression and Angio-Seal and Starclose arterial closure devices in common femoral punctures*. Cardiovasc Interv Radiol, 2007. **30**(2): p. 182-188.
53. Geyik, S., Yavuz, K., Akgoz, A., Koc, O., Peynircioglu, B., Cil, B., Cekirge, S., and Saatci, I., *The safety and efficacy of the Angio-Seal closure device in diagnostic and interventional neuroangiography setting: a single-center experience with 1,443 closures*. Neuroradiol, 2007. **49**(9): p. 739-746.
54. Öhrlein, R., Schilling, M., and Kreissler-Haag, D., *Chirurgische Komplikationen durch arterielle Punktionsverschlusssysteme*. Gefäßchirurgie, 2006. **11**(2): p. 108-112.
55. Aksoy, M., Becquemin, J.-P., Desgranges, P., Allaire, E., and Kobeiter, H., *The safety and efficacy of Angioseal in therapeutic endovascular interventions*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006. **32**(1): p. 90-93.
56. Resnic, F.S., Arora, N., Matheny, M., and Reynolds, M.R., *A cost-minimization analysis of the angio-seal vascular closure device following percutaneous coronary intervention*. Am J Cardiol, 2007. **99**(6): p. 766-770.
57. Baumgartner, W., *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. Vol. 8. aktualisierte Auflage. 2014, Stuttgart: Thieme Verlag.
58. Lepper, P.D.W. and Kelm, M., *Perioperative Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern*. Anaesthesist, 2007. **56**(6): p. 592-598.
59. Isfort, P., Tanaka, T., Penzkofer, T., Bruners, P., Tolba, R., Kuhl, C., and Mahnken, A., *Vascular closure devices after endovascular procedures in swine: a reliable method?* Scientific World Journal, 2014. **2014**.
60. Tellez, A., Cheng, Y., Yi, G.-H., Conditt, G.B., McGregor, J.C., Flynn, A.M., Ordanes, D., Mintz, G.S., Kaluza, G.L., and Granada, J.F., *In vivo intravascular ultrasound analysis of the absorption rate of the Angio-Seal vascular closure device in the porcine femoral artery*. EuroIntervention, 2010. **5**(6): p. 731-736.
61. Hofmann, L.V., Sood, S., Liddell, R.P., Gupta, A., Arepally, A., Rodriguez, E.R., and Eng, J., *Arteriographic and pathologic evaluation of two suture-*

- mediated arterial closure devices in a porcine model. J Vasc Interv Radiol*, 2003. **14**(6): p. 755-761.
62. Caldemeyer, K.S. and Buckwalter, K.A., *The basic principles of computed tomography and magnetic resonance imaging. J Am Acad Dermatol*, 1999. **41**(5): p. 768-771.
 63. Koo, V., Hamilton, P., and Williamson, K., *Non-invasive in vivo imaging in small animal research. Anal Cell Pathol*, 2006. **28**(4): p. 127-139.
 64. Alkadhi H., L.S., Stolzmann P., and Scheffel H., *Wie funktioniert CT? Eine Einführung in Physik, Funktionsweise und klinische Anwendung der Computertomographie*. 2011, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
 65. Vogl T.J., Reith, W., and Rummeny, E.J., *Diagnostische und Interventionelle Radiologie*. 2011, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
 66. Badea, C., Drangova, M., Holdsworth, D., and Johnson, G., *In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. Phys Med Biol*, 2008. **53**(19): p. R319.
 67. Hittmair, K., Wunderbaldinger, P., and Fleischmann, D., *Bolusoptimierte CT-Angiographie. Radiologe*, 1999. **39**(2): p. 93-99.
 68. Rankin, S., *CT angiography. Euro Radiol*, 1999. **9**(2): p. 297-310.
 69. Streicher, M., and Kindler, T.O., *Dreidimensionale, computertomographische Angiographie beim Hund*.
 70. Dörfler, A. and Engelhorn, T., *MR-und CT-Angiographie bei zerebrovaskulären Erkrankungen: Technik, Indikation und klinische Anwendung. Radiologie up2date*, 2006. **6**(01): p. 49-64.
 71. Prokop, M., G.M., Schaefer-Prokop, C., and Van der Molen, A.J., *Ganzkörper-Computertomographie, Spiral- und Multislice-CT*. Vol. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. 2007, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
 72. Bartolozzi, C., Neri, E., and Caramella, D., *CT in vascular pathologies. Eur Radiol*, 1998. **8**(5): p. 679-684.
 73. Bentoutou, Y., Taleb, N., El Mezouar, M.C., Taleb, M., and Jetto, L., *An invariant approach for image registration in digital subtraction angiography. Pattern Recogn*, 2002. **35**(12): p. 2853-2865.
 74. Harrington, D.P., Boxt, L.M., and Murray, P.D., *Digital subtraction angiography: overview of technical principles. Am Journal Roentgenol*, 1982. **139**(4): p. 781-786.
 75. Dawson, P., *Digital subtraction angiography—a critical analysis. Clin Radiol*, 1988. **39**(5): p. 474-477.
 76. Bash, S., Villablanca, J.P., Jahan, R., Duckwiler, G., Tillis, M., Kidwell, C., Saver, J., and Sayre, J., *Intracranial vascular stenosis and occlusive disease: evaluation with CT angiography, MR angiography, and digital subtraction angiography. AJNR Am J Neuroradiol*, 2005. **26**(5): p. 1012-1021.
 77. Jayaraman, M.V., Mayo-Smith, W.W., Tung, G.A., Haas, R.A., Rogg, J.M., Mehta, N.R., and Doberstein, C.E., *Detection of Intracranial Aneurysms: Multi-Detector Row CT Angiography Compared with DSA 1. Radiol*, 2004. **230**(2): p. 510-518.
 78. Strother, C., Bender, F., Deuerling-Zheng, Y., Royalty, K., Pulfer, K., Baumgart, J., Zellerhoff, M., Aagaard-Kienitz, B., Niemann, D., and Lindstrom, M., *Parametric color coding of digital subtraction angiography. AJNR Am J Neuroradiol*, 2010. **31**(5): p. 919-924.
 79. Michels, G., and Jaspers, N., *Sonographie organ- und leitsymptomorientiert*. 2012, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

80. Gross, M., *Sonographie, Schritt für Schritt zur Diagnose*. 2007, München: Urban & Fischer Verlag.
81. Lorenz, A., and Delorme, S., *Physikalische und technische Grundlagen der B-Bild-Sonographie*. Radiologe, 1999. **39**(7): p. 624-642.
82. Dietz, O., and Litzke, L.-F., *Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner*. 2004, Stuttgart: Enke Verlag.
83. Schmidt, G., and Görg, C., *Kursbuch Ultraschall: Nach den Richtlinien der DEGUM und der KBV*. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
84. Beuscher-Willems, B., Brüggmann, L., Grebe, T., Görg, C., and Schmidt, G., *Checkliste Sonographie*. 2004, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
85. Widder, B., von Reutern, G.-M., and Neuerburg-Heusler, D., *Morphologische und dopplersonographische Kriterien zur Bestimmung von Stenosierungsgraden an der A. carotis interna*. Ultraschall Med, 1986. **7**(02): p. 70-75.
86. Landwehr, P., Tschammler, A., and Höhmann, M., *Gefäßdiagnostik mit der farbkodierten Duplexsonographie*. Dtsch Med Wochenschr, 1990. **115**(09): p. 343-351.
87. Baumgartner, I., Maier, S., Koch, M., Schneider, E., von Schulthess, G., and Bollinger, A., *Magnetresonanzenarteriographie, Duplexsonographie und konventionelle Arteriographie zur Beurteilung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit*. In *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*. 1993. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
88. Anderson, C.R., Hu, X., Tlaxca, J., Decleves, A.-E., Houghtaling, R., Sharma, K., Lawrence, M., Ferrara, K., and Rychak, J.J., *Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent*. Invest Radiol, 2011. **46**(4): p. 215.
89. Deshpande, N., Needles, A., and Willmann, J.K., *Molecular ultrasound imaging: current status and future directions*. Clin Radiol, 2010. **65**(7): p. 567-581.
90. Kaufmann, B.A. and Lindner, J.R., *Molecular imaging with targeted contrast ultrasound*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(1): p. 11-16.
91. Kiessling, F., Fokong, S., Koczera, P., Lederle, W., and Lammers, T., *Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics*. J Nucl Med, 2012. **53**(3): p. 345-348.
92. Dayton, P.A. and Rychak, J.J., *Molecular ultrasound imaging using microbubble contrast agents*. Front Biosci, 2006. **12**: p. 5124-5142.
93. Dijkmans, P., Juffermans, L., Musters, R., van Wamel, A., Ten Cate, F., van Gilst, W., Visser, C., de Jong, N., and Kamp, O., *Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2004. **5**(4): p. 245-246.
94. Greis, C., *Molekulare Bildgebung mit kontrastmittelgestützter Sonografie (CEUS)*. In *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*. 2016. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
95. *Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*.
96. Goar, F.G.S., Fann, J.I., Komtebedde, J., Foster, E., Oz, M.C., Fogarty, T.J., Feldman, T., and Block, P.C., *Endovascular edge-to-edge mitral valve repair short-term results in a porcine model*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1990-1993.

97. Kim, H.-S., Cho, Y.-H., Kim, J.-S., Oh, Y.-T., Kang, H.-J., Chun, M.-S., Joh, C.-W., Park, C.-H., Park, K.-B., and Tahk, S.-J., *Effect of transcatheter endovascular radiation with holmium-166 on neointimal formation after balloon injury in porcine coronary artery*. J Nucl Cardiol, 2000. **7**(5): p. 478-483.
98. Fries, G., Wallenfang, T., Hennen, J., Velthaus, M., Heimann, A., Schild, H., Perneczky, A., and Kempfski, O., *Occlusion of the pig superior sagittal sinus, bridging and cortical veins: multistep evolution of sinus-vein thrombosis*. J Neurosurg, 1992. **77**(1): p. 127-133.
99. Höhle, P., *Zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovaskulärer Studien: Unterschiede der Gerinnungs-und Fibrinolyse-Systeme bei häufig verwendeten Tierspezies im Vergleich zum Menschen*. Aachen: RWTH Aachen Hochschulbibliothek-Medizin Fakultät-Dissertation, 2000. **19**.
100. Bijnens, A., Knockaert, I., Cousin, E., Kruithof, E., and Declerck, P., *Expression and characterization of recombinant porcine plasminogen activator inhibitor-1*. Thromb Haemost, 1997. **77**(2): p. 350-356.
101. Hiebl, B., Müller, C., Hünigen, H., Gemeinhardt, O., Plendl, J., Jung, F., Hamm, B., and Niehues, S., *Gross anatomical variants of the vasculature of the Göttingen TM minipig*. Appl Cardiopulm Pathophysiol, 2010. **14**: p. 236-243.
102. Hon, L., Ganeshan, A., Thomas, S., Warakaulle, D., Jagdish, J., and Uberoi, R., *An overview of vascular closure devices: what every radiologist should know*. Eur J Radiol, 2010. **73**(1): p. 181-190.
103. Goyen, M., Manz, S., Kröger, K., Massalha, K., Haude, M., and Rudofsky, G., *Interventional therapy of vascular complications caused by the hemostatic puncture closure device Angio- Seal*. Catheter Cardiovasc Interv, 2000. **49**(2): p. 142-147.
104. Kadner, A., Schmidli, J., Schwegler, I., Dick, F., Schönhoff, F., Carrel, T., and Savolainen, H., *Complications associated with the arterial puncture closure device—Angio-Seal*. Vasc Endovas Surg, 2008. **42**(3): p. 225-227.
105. Carey, D., Martin, J.R., Moore, C.A., Valentine, M.C., and Nygaard, T.W., *Complications of femoral artery closure devices*. Catheter Cardiovasc Interv, 2001. **52**(1): p. 3-7.
106. Warren, B.S., Warren, S.G., and Miller, S.D., *Predictors of complications and learning curve using the Angio- Seal™ closure device following interventional and diagnostic catheterization*. Catheter Cardiovasc Interv, 1999. **48**(2): p. 162-166.
107. Biancari, F., Ylönen, K., Mosorin, M., Lepojärvi, M., and Juvonen, T., *Lower limb ischemic complications after the use of arterial puncture closure devices*. Eur J Vasc Endovas Surg, 2006. **32**(5): p. 504-505.
108. Castelli, P., Caronno, R., Piffaretti, G., Tozzi, M., and Lomazzi, C., *Incidence of vascular injuries after use of the Angio-Seal closure device following endovascular procedures in a single center*. World J Surg, 2006. **30**(3): p. 280-284.
109. Abbott Vascular, *StarClose SE Vascular Closure System Instructions for Use*. 29.02.2016]; Available from: http://www.abbottvascular.com/docs/ifu/vessel_closure/eIFU_StarcloseSE.pdf.
110. Applegate, R.J., Sacrinty, M., Kutcher, M.A., Gandhi, S.K., Baki, T.T., Santos, R.M., and Little, W.C., *Vascular complications with newer generations of angioseal vascular closure devices*. J Interv Cardiol, 2006. **19**(1): p. 67-74.
111. Wong, S.C., Bachinsky, W., Cambier, P., Stoler, R., Aji, J., Rogers, J.H., Hermiller, J., Nair, R., Hutman, H., and Wang, H., *A randomized comparison*

- of a novel bioabsorbable vascular closure device versus manual compression in the achievement of hemostasis after percutaneous femoral procedures: the ECLIPSE (Ensure's Vascular Closure Device Speeds Hemostasis Trial). JACC: Cardiovasc Interv, 2009. **2**(8): p. 785-793.
112. Duffin, D., Muhlestein, J., Allisson, S., Horne, B., Fowles, R., Sorensen, S., Revenaugh, J., Bair, T., and Lappe, D., *Femoral arterial puncture management after percutaneous coronary procedures: a comparison of clinical outcomes and patient satisfaction between manual compression and two different vascular closure devices*. J Invasive Cardiol, 2001. **13**(5): p. 354-362.
 113. Vaitkus, P.T., *A meta-analysis of percutaneous vascular closure devices after diagnostic catheterization and percutaneous coronary intervention*. J Invasive Cardiol, 2004. **16**(5): p. 243-246.
 114. Bismuth, J., Kashef, E., Cheshire, N., and Lumsden, A.B., *Feasibility and safety of remote endovascular catheter navigation in a porcine model*. J Endovasc Ther, 2011. **18**(2): p. 243-249.
 115. Garosi, L. and McConnell, J., *Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review*. J Small Anim Pract, 2005. **46**(11): p. 521-529.
 116. Wessmann, A., Chandler, K., and Garosi, L., *Ischaemic and haemorrhagic stroke in the dog*. Vet J, 2009. **180**(3): p. 290-303.
 117. Dahme, E., and Weiss, E., *Grundrisse der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Vol. 6. völlig neu bearbeitete Auflage. 2007, Stuttgart: Enke Verlag.
 118. Bertolini, G., *Incidental Intracranial Aneurysm in a Dog Detected by 16-Multidetector Row Computed Tomography Angiography*. Case Report. Vet Med, 2013. **2013**.
 119. Stehbens, W., *Cerebral aneurysms of animals other than man*. J Pathol Bacteriol, 1963. **86**(1): p. 161-168.
 120. Miller, D.L., Schrecengost, J., Kilgo, J., Ray, H.S., and Miller, K.V., *Ruptured aortic aneurysm in a coyote (Canis latrans) from South Carolina*. J Zoo Wildl Med, 2007. **38**(3): p. 492-494.
 121. Ploeg, M., Saey, V., De Bruijn, C., Gröne, A., Chiers, K., van Loon, G., Ducatelle, R., Van Weeren, P., Back, W., and Delesalle, C., *Aortic rupture and aorto-pulmonary fistulation in the Friesian horse: Characterisation of the clinical and gross post mortem findings in 24 cases*. Equine Vet J, 2013. **45**(1): p. 101-106.
 122. Shirai, W., Momotani, E., Sato, T., Kashima, T., Saito, T., and Itoi, Y., *Dissecting aortic aneurysm in a horse*. J Comp Pathol, 1999. **120**(3): p. 307-311.
 123. Angelos, J., Anderson, B., Waurzyniak, B., Ames, T., and Turner, T., *Aneurysm of the cranial mesenteric artery in a cow*. J Am Vet Med Assoc, 1995. **207**(5): p. 623-625.
 124. McConnell, J., Garosi, L., and Platt, S., *Magnetic resonance imaging findings of presumed cerebellar cerebrovascular accident in twelve dogs*. Vet Radiol Ultrasound, 2005. **46**(1): p. 1-10.
 125. Hildebrandt, N., *Transvenöse Embolisation des persistierenden Ductus arteriosus ($\leq 4, 0$ mm) mit einem singulären Coil beim Hund*, Dissertation, Universitätsbibliothek Giessen, 2006.
 126. Henrich, E., *Transvenöse Embolisation des mittelgroßen persistierenden Ductus arteriosus (2, 6-4, 0 mm) mit einem neuen Coil-System beim Hund*, Dissertation, Universitätsbibliothek Giessen, 2011.

127. Campbell, F., Thomas, W., Miller, S., Berger, D., and Kittleson, M., *Immediate and late outcomes of transarterial coil occlusion of patent ductus arteriosus in dogs*. J Vet Intern Med, 2006. **20**(1): p. 83-96.
128. Nguyenba, T.P. and Tobias, A.H., *The Amplatz® canine duct occluder: a novel device for patent ductus arteriosus occlusion*. J Vet Cardiol, 2007. **9**(2): p. 109-117.
129. Van Der Giessen, W.J., Lincoff, A.M., Schwartz, R.S., van Beusekom, H.M., Serruys, P.W., Holmes, D.R., Ellis, S.G., and Topol, E.J., *Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1690-1697.
130. Yuki, I., Lee, D., Murayama, Y., Chiang, A., Vinters, H.V., Nishimura, I., Wang, C.J., Ishii, A., Wu, B.M., and Viñuela, F., *Thrombus organization and healing in an experimental aneurysm model. Part II. The effect of various types of bioactive bioabsorbable polymeric coils*. J Neurosurg. 2007. **107**(1): p. 109-20.
131. Choi, Y.-H., Namgung, J., Choe, H., Kwon, S.U., Doh, J.H., Lee, S.Y., Kim, C.Y., Chang, W.-I., and Lee, W.R., *Three cases of arterial occlusion that occurred after the use of Angioseal®*. Korean Circ J, 2008. **38**(6): p. 339-342.
132. Solymosi, L., Chapot, R., and Bendszus, M., *Stent, Ballon oder Clip?* Klin Neuroradiol, 2005. **15**(3): p. 145-160.
133. Lylyk, P., Cohen, J.E., Ceratto, R., Ferrario, A., and Miranda, C., *Endovascular reconstruction of intracranial arteries by stent placement and combined techniques*. J Neurosurg, 2002. **97**(6): p. 1306-1313.
134. Inoue, T., Croce, K., Morooka, T., Sakuma, M., Node, K., and Simon, D.I., *Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis*. JACC Cardiovasc Interv, 2011. **4**(10): p. 1057-1066.
135. Chaabane, C., Otsuka, F., Virmani, R., and Bochaton-Piallat, M.-L., *Biological responses in stented arteries*. Cardiovasc Res, 2013: p. cvt115.
136. Hood, J.D. and Cheresh, D.A., *Role of integrins in cell invasion and migration*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 91-100.
137. Jin, H., and Varner, J., *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. Br J Cancer, 2004. **90**(3): p. 561-565.
138. Zee, R.V., Murohara, T., Passeri, J., Kearney, M., Cheresh, D.A., and Isner, J.M., *Reduced Intimal Thickening Following $\alpha v \beta 3$ Blockade is Associated with Smooth Muscle Cell Apoptosis*. Cell Commun Adhes, 1998. **6**(5): p. 371-379.
139. Kappert, K., Blaschke, F., Meehan, W.P., Kawano, H., Grill, M., Fleck, E., Hsueh, W.A., Law, R.E., and Graf, K., *Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta*. Basic Res Cardiol, 2001. **96**(1): p. 42-49.
140. Bendeck, M.P., Irvin, C., Reidy, M., Smith, L., Mulholland, D., Horton, M., and Giachelli, C.M., *Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via $\alpha v \beta 3$ integrin*. Arterioscler Thromb Vasc Bio, 2000. **20**(6): p. 1467-1472.
141. Corjay, M.H., Diamond, S.M., Schlingmann, K.L., Gibbs, S.K., Stoltenborg, J.K., and Racanelli, A.L., *$\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, and osteopontin are coordinately upregulated at early time points in a rabbit model of neointima formation*. J Cell Biochem, 1999. **75**(3): p. 492-504.

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Lisa Kabelitz

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marc A. Brockmann für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine stets kompetente Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer danke ich besonders für die Betreuung und wertvolle Unterstützung sowie Korrektur meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Martin Wiesmann danke ich für die Aufnahme in das Team der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie der Uniklinik RWTH Aachen und seine fortwährende Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich meinen beiden Kolleginnen Dr. Andrea Nonn und Dr. Stefanie Kirschner für ihre wertvolle Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch dem Team des Instituts für Versuchstierkunde der Uniklinik RWTH Aachen für die stets kompetente Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützt und nie an meinem Weg gezweifelt haben. Dank Ihnen konnte ich mein Studium und diese Arbeit erfolgreich abschließen.

Nicht zuletzt danke ich all meinen Freunden und Kollegen, die mich auf unterschiedliche Weise während meiner Dissertation unterstützt haben.